

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



TESIS DOCTORAL

**Biocumulación, toxicidad e interacción de
metilmercurio y especies de selenio**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Susana Cuello Núñez

DIRECTORAS

**Carmen Cámara Rica
Yolanda Madrid Albarrán**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOCUMULACIÓN, TOXICIDAD E
INTERACCIÓN DE METILMERCURIO Y
ESPECIES DE SELENIO**

Bajo la dirección de las Doctoras:

**Carmen Cámara Rica
Yolanda Madrid Albarrán**

Susana Cuello Núñez

MADRID, 2015

Dra. CARMEN CÁMARA RICA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

Dra. YOLANDA MADRID ALABARRÁN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

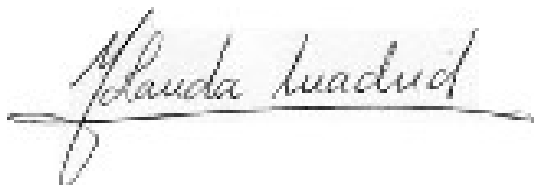
HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo titulado **“Bioacumulación, toxicidad e interacción del metilmercurio y especies de selenio”** ha sido realizado por la Licenciada Dña. Susana Cuello Núñez en este Departamento, y bajo su supervisión, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 1 de Octubre de 2015



Fdo.: Carmen Cámara Rica



Fdo.: Yolanda Madrid Albarrán

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, la Dra. Yolanda Madrid y la Dra. Carmen Cámara. Gracias Yolanda por esa llamada a mi casa hace unos años atrás, ofreciéndome una beca que me abrió las puertas en esta larga aventura del Doctorado, gracias por ser la primera en brindarme esta oportunidad. Carmen, aunque no nos conocíamos antes de que empezara el doctorado, gracias por confiar y apostar por mí. Y sobre todo, gracias a las dos porque sin vuestros conocimientos, consejos y apoyo no hubiera llegado a alcanzar esta meta.

Dar las gracias al departamento de Química Analítica, donde realicé los cursos de doctorado y muchos de los experimentos de la presente Tesis.

Agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme la beca FPU para realizar los estudios de Doctorado.

Esta Tesis no es solo el reflejo de los experimentos realizados por una persona, sino del conjunto de personas de mi grupo de investigación, todas y cada una de ellas han aportado su granito de arena a estas páginas. Así que gracias a M^a Antonia, Mila, Ana, Conchita, Mariluz, Benito. Gracias a mis chicas de al lado Rian y Teresa por ser como sois y siempre tener una palabra o dos cuando las cosas se tuercen. Gracias a ti Jon, por estar ahí sin pedírtelo y porque pase lo que pase se que siempre podré contar contigo. Gracias Jose, que aunque llegaste casi al final fuiste una persona clave en esta Tesis, gracias por introducirme en el mundo de la proteómica y por confiar en mi tanto en lo personal como en lo científico. Gracias a los compis de laboratorio que estaban ahí cuando llegué: Christian, Zoyne, Mer, Diego, Adriana, Rocío, Estrella, Carmen, que compartieron sus conocimientos conmigo y me adoptaron como una más de la familia. A los que llegaron después: Mabel, Maria P, Luz, María S, Estefanía, Laura, Noe, Pablo, Sonia, Ani, Irene, Raquel, Nines, Soumaya, Lucía, Ángeles, Erik, Marilyn, Melissa, Héctor, Daniela, Nuria, con los que compartimos muchas horas de laboratorio juntos, esas cañitas de los viernes, esos intentos de karaoke frustrados en Villaviciosa o ir a ese bar de moda donde Mario Casas va de cuando en cuando, a todos y cada uno de vosotros gracias por formar parte de esta etapa tan importante de mi vida.

A María Pedrero y Susana, gracias por colaborar con nosotros.

A Sonia, Daniel, Lola, Vanesa que aunque no trabajamos codo con codo siempre supe que tenía vuestro apoyo, gracias por ello.

No solo pasé mi tesis subiendo y bajando las escaleras del departamento de Química Analítica, también tuve la suerte de trabajar en otros lugares. Gracias a la gente del Instituto del Frío, que fue mi segunda casa científicamente hablando, pero en especial he de agradecer a Luis, Laura, Nines, Raquel y sobre todo a Sonia, no sé cuantas incubaciones habremos hecho juntas, pero lo que sí sé es que sin ti esta Tesis no hubiera sido lo mismo. Gracias a Pilar e Isabel por abrirme las puertas del CNIO para realizar los últimos, pero no menos importantes, experimentos de mi Tesis.

A mis compañeros de trabajo de LGC, por animarme a no tirar la toalla antes de tiempo, *thanks so much!*

A Heidi, por su apoyo incondicional.

A Chris Hopley y sus conocimientos de informática, sin él hubiera tenido que reescribir parte de la Tesis, *I am so grateful!*

A mis amigos de Granada, de la *Uni*, de Villa, de Barcelona, a la Spanish Mafia de Londres, a todos vosotros gracias por elegirme y ser parte de vuestras vidas, pero sobre todo agradecer a María, mi confidente y mi mejor amiga, sin duda alguna tú has jugado un papel esencial en esta etapa y en mi vida, no cambies nunca!

A un escocés llamado Bryan, gracias por creer en mí y por hacerme volver a creer, y por compartir las últimas paradas de este viaje, *I love you!*

Por último y más importante, gracias a mi familia, sobre todo a mis padres, mi hermana, mi cuñado y la niña de mis ojos: Alejandra, porque, sin duda alguna, si he llegado hasta aquí es porque nunca, nunca, me ha faltado vuestro apoyo. Os quiero y os querré siempre.

GRACIAS!!!

"Me lo contaron y lo olvidé;
lo vi y lo entendí;
lo hice y lo aprendí"

Confucio

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
OBJETIVOS	12
INTRODUCCIÓN	14
1. Selenio	15
1.1 Características físico-químicas del selenio	15
1.2 Ciclo biogeoquímico del selenio	17
1.3 Esencialidad y toxicidad del selenio	20
2. Estrés oxidativo y mecanismos de defensa	29
2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	29
2.2 Sistema de defensa enzimáticos	32
2.3 Sistema de defensa no enzimáticos	33
3. Mercurio	33
3.1 Características físico-químicas del mercurio	33
3.2 Especies presentes en el medio ambiente	35
3.3 Ciclo biogeoquímico del mercurio	38
3.4 Toxicidad del mercurio	39
4. Interacción mercurio-selenio	41
4.1 Mecanismos de interacción entre selenio y mercurio	42
5. Apoptosis y rutas de proliferación y supervivencia	45
5.1 Apoptosis	45
5.2 Rutas de señalización y supervivencia	49
6. Metodología para la determinación y especiación de selenio y mercurio	50
6.1 Tratamiento de muestra	50
6.2 Metodología para la determinación de selenio y sus especies	54
6.3 Metodología para la determinación de mercurio y sus especies	71
7. Bioacumulación de elementos traza:	
determinación de factores de bioconcentración	78
7.1 Medida experimental del factor de bioconcentración (BCF)	79
7.2 Métodos alternativos al ensayo OCDE 305	80
8. Proteómica cuantitativa para evaluar la toxicidad de los elementos traza	84
8.1 Metodologías empleadas en proteómica para evaluar la toxicidad de los metales pesados	86
8.2 Metodologías empleadas en proteómica cuantitativa	88

PARTE EXPERIMENTAL	97
1. Se-metil-selenocisteína como agente protector del estrés oxidativo	98
2. Mecanismos moleculares de muerte inducida por metilmercurio en células de hepatoma humano Hep G2	114
3. Estudios de acumulación en el pez cebra	123
4. Proteómica cuantitativa y toxicidad de metilmercurio	143
DISCUSIÓN INTEGRADORA	212
1. Mercurio	213
1.1 Toxicidad	213
1.2 Metodología para la determinación de mercurio y sus especies	227
1.3 Bioacumulación empleando larvas de pez cebra	230
2. Selenio	235
2.1 Se-metil-selenocisteína como agente protector del estrés oxidativo	237
2.2 Selenio como agente protector contrala toxicidad provocada por metilmercurio	241
2.3 Bioacumulación empleando larvas de pez cebra	244
CONCLUSIONES	246
GLOSARIO DE TÉRMINOS	249
REFERENCIAS	254

RESUMEN

El metilmercurio (MeHg) es uno de los compuestos de mercurio más tóxicos presente en el medioambiente. Desde los años setenta se sabe que el 99% de las especies de mercurio en el plasma sanguíneo son capaces de unirse a los grupos tioles de las proteínas pudiendo así transportarse desde la sangre a diversos órganos. La acumulación de MeHg en el riñón y el hígado es capaz de inducir cambios patológicos en ambos órganos.

El mecanismo por el cual el MeHg ejerce su toxicidad no está bien definido. Por este motivo uno de los objetivos de la presente Tesis es la evaluación de la toxicidad ejercida por el MeHg mediante el empleo de técnicas de biología molecular y estrategias de proteómica cuantitativa (SILAC y iTRAQ).

Por otro lado, el selenio es un micronutriente esencial que forma parte de algunas enzimas (glutathion peroxidasa y 1-iodotironina 5-deiodinasa). Además, hay evidencias de que algunos de los compuestos de selenio (Se-metilselenocisteína en particular) son capaces de actuar frente a diversos tipos de cáncer. Otra característica adicional a destacar de los compuestos de selenio es la capacidad de reducir los efectos tóxicos de los compuestos de mercurio. Para tener un conocimiento más profundo de los hechos anteriormente mencionados, en la presente Tesis se han realizado estudios *in vitro* enfocados hacia la evaluación del papel del selenio como agente antioxidante y protector de los efectos tóxicos causados por el metilmercurio en células de hepatoma humano (Hep G2).

La última parte de esta Tesis está relacionada con la bioacumulación de mercurio y selenio, y su evaluación mediante el empleo de larvas del pez cebra como posible modelo alternativo para ensayos de bioconcentración. El conocimiento de los factores de bioconcentración/bioacumulación de las sustancias químicas, tanto en animales como en personas, es un tema de vital importancia ya que dependiendo de sus características puede conllevar graves riesgos para la salud. Desafortunadamente, existen pocos datos disponibles sobre la bioacumulación de las sustancias químicas, y la generación de nuevos datos empleando el test OECD TG 305 (test para la determinación de la bioconcentración de las sustancias químicas en peces) requiere de mucho tiempo, elevado coste y necesita un número elevado de peces adultos. Como

alternativa al test OECD TG 305, en la presente Tesis se ha evaluado el empleo de larvas de pez cebra, las cuales se han utilizado ampliamente tanto en ecotoxicología como en toxicología humana, como posible modelo para conocer los factores de bioconcentración de ciertas especies. Las larvas del pez cebra presentan la ventaja de no ser consideradas animal de laboratorio por la Directiva de la UE 86/609 / CEE relativa a la protección de los animales utilizados para la investigación experimental y otros objetivos científicos. Poseen una composición genética muy similar a la humana y permiten realizar los ensayos en menor tiempo y con mucho menor costo que el empleo de peces adultos.

Los dos compuestos evaluados en los estudios de bioacumulación en la presente memoria han sido el MeHg y el selenito sódico. El MeHg se seleccionó debido a su carácter lipofílico, a su capacidad de acumulación en los tejidos de los peces y a su capacidad de biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica. El selenito posee propiedades tóxicas a altas concentraciones, de hecho hay evidencias de que elevados niveles de selenio en sistemas acuáticos ha llegado a causar la eliminación de comunidades de peces.

Los factores de bioconcentración para estos compuestos fueron calculados empleando las larvas de pez cebra como modelo y los resultados se compararon con datos ya publicados para comprobar la idoneidad del método utilizado con larvas.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is the most important form of mercury in terms of toxicity from environmental exposure making it a persistent health concern. It has been known since at least the early 1970s that 99% of mercury species circulating in blood plasma are bound to protein bound thiol groups and it was speculated that this is the mechanism of transport of mercury into organs. Severe MeHg accumulation in the kidney and the liver induces pathological changes in these organs.

MeHg has been suggested to exert toxicity through multiple mechanisms but the precise biochemical machinery by which MeHg induces cytotoxicity has not been fully defined, therefore, one of the objectives of this thesis was the evaluation of biomolecular mechanisms of MeHg-Induced toxicity through molecular biology techniques and proteomic strategies (SILAC and iTRAQ).

On the other hand, selenium is an essential micronutrient for humans and also a constituent of enzymes (such as glutathione peroxidase and 1-iodothyronine 5-deiodinase). In addition, it is recognised that Se-compounds - particularly Se-Methylselenocysteine (Se-MeCys) - provide protection against various forms of cancer. Furthermore, interactions between Mercury and Selenium are arousing high interest because a protective function of Se against toxic effects caused by mercury has been reported. To prove all the facts mentioned above and to get a deeper knowledge of the protection properties of selenocompounds, the current thesis presents an in-vitro study where the protective effect of selenium against oxidative stress and toxic effects caused by methylmercury in human hepatocytes (Hep G2) were evaluated.

The last topic presented in this thesis is related with bioaccumulation and the validation as an alternative method for bioconcentration assays. Bioaccumulation of certain chemicals in wildlife and human tissues is becoming an important public concern as it can be the cause of important health problems. Limited bioaccumulation data is available for many chemicals and generation of new data using the OECD TG 305 standard (bioconcentration test, which describes a procedure for characterising the bioconcentration potential of substances in fish) is very time consuming, costly and requires considerable animal use. As an alternative to the OECD TG 305, zebrafish larvae were studied as they are considered an excellent alternative model for

toxicological assessment because it represents the complex dynamic, interactive and multi-organ environment that occurs *in vivo* in the context of a complete organism that is not considered a laboratory animal by the Directive 86/609/EEC.

One of the chemicals used in the bioaccumulation studies was MeHg. The reason for choosing a mercury compound for these experiments is due to the fact that it has been shown to be a persistent pollutant occurring in a variety of forms in freshwater and marine ecosystems. Moreover, mercury tends to accumulate in fish tissue, particularly, in the form of methylmercury (MeHg), because of its lipophilicity, methylmercury accumulates throughout the food chain can be biomagnified through every step of the food chain up to humans. The other element chosen was selenium (in the form of Se (IV)) as this element also has toxic properties at high concentrations, in fact, there is evidence that it can be responsible for reproductive failure in fish.

The bioconcentration factors for these two compounds were estimated using the zebra fish larvae model and the results compared with others already published to prove the suitability of this alternative model.

Objetivos

OBJETIVOS

La toxicidad del mercurio y en especial de las formas metiladas es, en la actualidad, bien conocida. Por este motivo, la primera parte de la presente Tesis Doctoral pretende evaluar la toxicidad del metilmercurio desde diferentes puntos de vista:

- Se llevarán a cabo estudios *in vitro* en los que las células serán incubadas con MeHg para así poder evaluar su efecto sobre diversos parámetros bioquímicos.

- Se utilizarán técnicas de proteómica cuantitativa (SILAC y iTRAQ) con el objetivo de obtener información sobre las proteínas afectadas por el efecto de la exposición a metilmercurio.

- Se usarán larvas de pez cebra para determinar los factores de bioacumulación de MeHg y al mismo tiempo evaluar su idoneidad como modelo alternativo en los ensayos de bioacumulación. Para ello, se desarrollarán metodologías analíticas para la determinación de mercurio en las larvas expuestas.

La segunda parte de esta Tesis Doctoral se centrará en el papel que tiene el selenio como antioxidante y en la interacción del selenio con el mercurio. Los objetivos que se pretenden son:

- Evaluar la protección ejercida por la especie selenometilselenocisteína (SeMeSeCys) mediante la evaluación de diversos parámetros bioquímicos. Para ello se llevarán a cabo estudios *in vitro* en los que se someterán las células a un estrés con una sustancia oxidante, el *tert*-butil hidroperóxido.
- Estudiar las posibles biotransformaciones de la SeMeSeCys dentro de la célula durante el proceso de protección antioxidativa. Con este fin se llevarán a cabo estudios de especiación mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.
- Obtener información de los mecanismos de protección del selenio frente al mercurio tras someter cultivos celulares al efecto de selenio y mercurio de forma conjunta.

Introducción

1. SELENIO

1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SELENIO

El selenio (del griego σελήνιον, resplandor de la Luna) fue descubierto en 1817 por Jöns Jacob Berzelius. Al visitar la fábrica de ácido sulfúrico de Gripsholm observó un líquido pardo rojizo que calentado al soplete desprendía un olor fétido que se consideraba entonces característico y exclusivo del telurio —de hecho su nombre deriva de su relación con este elemento ya que telurio proviene del latín Tellus, la Tierra— resultando de sus investigaciones el descubrimiento del Selenio. Más tarde, el avance de las técnicas de análisis permitió detectar su presencia en distintos minerales pero siempre en cantidades extraordinariamente pequeñas¹.

Su historia reciente ha demostrado que pocas veces el nombre de un elemento ha sido tan bien elegido ya que, así como el cuerpo celeste que le dio nombre, el elemento nos muestra dos caras: una oscura, la otra brillante. Por un lado es un tóxico poderoso, por el otro se ha revelado como uno de los elementos traza esenciales, sin cuya participación en nuestros procesos metabólicos, no podríamos sobrevivir. El Selenio pertenece al grupo VIA, actualmente grupo 16, de la Tabla Periódica situado entre el Azufre y el Teluro, y en el periodo 4 entre el Arsénico y el Bromo. La configuración electrónica y su posición en la Tabla Periódica, hacen que sus propiedades físico-químicas sean intermedias entre los metales y los no-metales. Posee una configuración electrónica externa $3d^{10}4s^24p^4$ y puede presentar cuatro estados de oxidación: (-II), 0, (IV) y (VI). Con el estado de oxidación (-II), presenta su química de no metal con el hidrógeno y con elementos metálicos, dando lugar a sales insolubles en suelos. Por otro lado, da lugar a la mayoría de las especies orgánicas (organometálicos), formando compuestos metilados.

El estado de oxidación (0) corresponde al selenio elemental, presente en la naturaleza bajo diferentes formas alotrópicas:

- El selenio rojo, que puede aparecer como sólido amorfo de estructura vítrea, o bien bajo dos formas cristalinas α y β , ambas de geometría monoclinica pero diferente estructura molecular².

- El selenio gris o metálico, de geometría hexagonal, es considerado la forma más estable de este elemento³.

- El selenio negro, posee estructura vítrea, y es la forma comercial ordinaria del metal³.

Los estados de oxidación (IV) y (VI) dan lugar a compuestos inorgánicos como haluros (SeF_4 , SeF_6), óxidos (SeO_2 , SeO_3) y ácidos (H_2SeO_3 , H_2SeO_4). Muchas oxisales (selenitos y seleniatos) son solubles en agua⁴

A pesar de la similitud entre el selenio y el azufre en sus propiedades físicas y químicas, tanto en sus formas elementales como en muchos de sus compuestos, el Selenio y el Azufre no pueden sustituirse mutuamente *in vivo*. Una posible razón para ello tal vez deba buscarse en el diferente comportamiento redox de sus estados de oxidación más importantes. Así, mientras el Azufre (VI) en el SO_4^{2-} tiende a oxidarse⁵, el Selenio (VI) en el SeO_4^{2-} tiende a reducirse, una tendencia que también puede observarse en los seres vivos, en los que los compuestos de Selenio tienden usualmente a reducirse.

Por otra parte, a pesar de que los oxoácidos de ambos elementos tienen estructuras y constantes de acidez similares, el H_2Se es un ácido mucho más fuerte que el H_2S . Esta diferencia es, seguramente muy importante en el comportamiento biológico de los restos $-\text{SH}$ y $-\text{SeH}$, presentes en residuos de aminoácidos y proteínas. Debido a la diferencia entre sus valores de pK ($\text{pK } -\text{SeH} = 5,25$; $\text{pK } -\text{SH} = 8,25$), a pH fisiológico el grupo SH de la cisteína y de otros tioles permanece, esencialmente, en forma protonada, mientras que el grupo SeH de la selenocisteína y de otros selenoles estará, fundamentalmente, en forma disociada⁵

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del Selenio

Propiedades	
Número atómico	34
Masa atómica	78,96
Densidad, g/cm^3	4,79
Punto de fusión, $^{\circ}\text{C}$	217
Punto de ebullición, $^{\circ}\text{C}$	685,4

Tabla 1. (Continuación)

Propiedades	
Radio atómico, μm	0,117
Calor latente de fusión, J/g	6,91
Calor de vaporización, J/g	272,98
Conductividad térmica, $\text{W}/(\text{m}\cdot^{\circ}\text{C})$	0,293-0,766

Existen seis isótopos estables del Selenio:

^{74}Se (0,87 %), ^{76}Se (9,02 %), ^{77}Se (7,58 %), ^{78}Se (23,52%), ^{80}Se (49,82%), ^{82}Se (9,19 %).

También existen tres isótopos de corta vida empleados en técnicas radiológicas y en activación neutrónica:

^{75}Se , $^{77\text{m}}\text{Se}$ y $^{82\text{m}}\text{Se}$.⁶

1.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL SELENIO

Para conocer el comportamiento del Selenio en el medioambiente es necesario estudiar las biotransformaciones que conforman su ciclo biogeoquímico, lo que implica conocer su disponibilidad geológica y sus propiedades químicas, así como la actividad biológica de los organismos que utilizan este elemento.

Su ciclo biogeoquímico es análogo en algunos aspectos al del azufre (S).⁷

El pH y las condiciones redox del medio juegan un papel importante en la especiación del Se (Ver Figura 1). Otros factores importantes de los que depende su concentración, transformación, movilidad y acumulación en un ambiente dado, son la temperatura, la presencia de otros compuestos inorgánicos, así como la actividad microbiana y antropogénica⁸

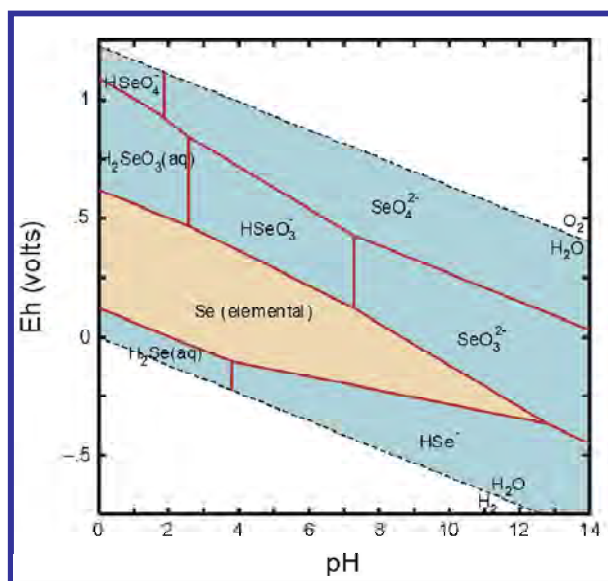


Figura 1. Diagrama E-pH del selenio en concentración 0,01M

Los seleniatos son muy solubles en agua, siendo este anión predominante en la disolución de los suelos básicos bien drenados. Los selenitos son menos solubles y además el selenito posee una elevada afinidad por las superficies reactivas de oxihidróxidos de hierro y aluminio, siendo adsorbido mediante un mecanismo de intercambio de ligandos⁹

Por otro lado, el selenio elemental, Se^0 , es muy insoluble en agua y tiene una cinética de reacción extremadamente lenta, por lo que su presencia en medios oxidantes es frecuente a pesar de ser termodinámicamente inestable en ellos¹⁰. Los selenuros puedan hallarse formando sales con metales en yacimientos de sulfuros metálicos, todas ellas muy insolubles¹⁰ mientras que en suelos también se pueden encontrar como compuestos orgánicos, algunos de ellos en disolución. Finalmente, las formas volátiles del Se más comunes son dimetilselenuros (DMSe ; $[\text{CH}_3]_2\text{Se}$) y dimetildiselenuros (DMDSe ; $[\text{CH}_3]_2\text{Se}_2$) con una toxicidad demostrada en ratas de entre 500 a 700 veces menor que la de los oxianiones SeO_4^{2-} y SeO_3^{2-} ²⁻¹¹.

Las plantas absorben e incorporan Se en su biomasa, aunque su tolerancia y capacidad de bioacumulación depende de las distintas especies de selenio y variedad vegetal¹².

La concentración de Se en tejidos de plantas acumuladoras de este elemento, (p.e. *Astragalus*, *Machaeranthera*, *Haplopappus*, y *Stanleya*) puede ser de hasta varios miles de mg kg^{-1} , mientras que las no acumuladoras, entre ellas la mayoría de plantas de cultivo, raramente alcanzan valores superiores a 50 mg Se kg^{-1} , aún creciendo en suelos con elevados contenidos en $\text{Se}^{13,14}$. La absorción de Se tiene lugar preferentemente en forma de SeO_4^{2-} . Este anión entra en los tejidos vegetales a través de las sulfotransferasas, incapaces de discriminar entre ambos oxianiones, e interfiere en reacciones bioquímicas esenciales de las plantas al sustituir al S e incorporarse a aminoácidos proteicos para formar selenocisteína y selenometionina^{12,15}. En el caso de las plantas acumuladoras de Se, éste se incorpora a aminoácidos no proteicos por lo que no interfiere en el metabolismo de las mismas¹². La capacidad de las plantas de volatilizar este elemento varía según sean o no acumuladoras de Se. Mientras las plantas acumuladoras producen DMDSe, las no acumuladoras volatilizan Se en forma de DMSe¹⁶.

Las transformaciones microbianas del Se pueden afectar a su biodisponibilidad respecto a plantas y animales^{17,18}. Bacterias anaeróbicas o facultativas pueden utilizar SeO_4^{2-} como aceptor final de electrones en su respiración (reducción disimilatoria) y de esta forma reducirlo a SeO_3^{2-} y, en último término, a $\text{Se}(0)$ ¹⁹. Asimismo, también se ha observado la reducción microbiana de SeO_4^{2-} a SeO_3^{2-} y finalmente a $\text{Se}(0)$ en procesos no relacionados con la respiración^{20,21}, posiblemente como mecanismos de detoxificación¹⁸. Los microorganismos son capaces de volatilizar Se a DMSe y DMDSe para lo que necesitan reducir previamente de forma asimilatoria el Se presente en el medio externo a seleniuro orgánico¹⁸. Al parecer, el proceso de metilación microbiana del Se tendría una función detoxificadora²².

La transferencia de selenio desde el medioambiente al hombre y animales procede principalmente de dos vías: inhalación e ingestión. La incorporación de este elemento a través del aire es muy baja, proporcionando una concentración de aproximadamente $0,02 \text{ ng/g}$, mientras que por la ingestión de aguas y alimentos este nivel asciende a $0,1 \text{ } \mu\text{g/g}^{23}$. Los mayores aportes de selenio en el hombre proceden del consumo de vegetales, pescados y mariscos.

El ciclo biogeoquímico del selenio aparece esquematizado en la Figura 2, adaptada de Potin-Gautier y col⁸.

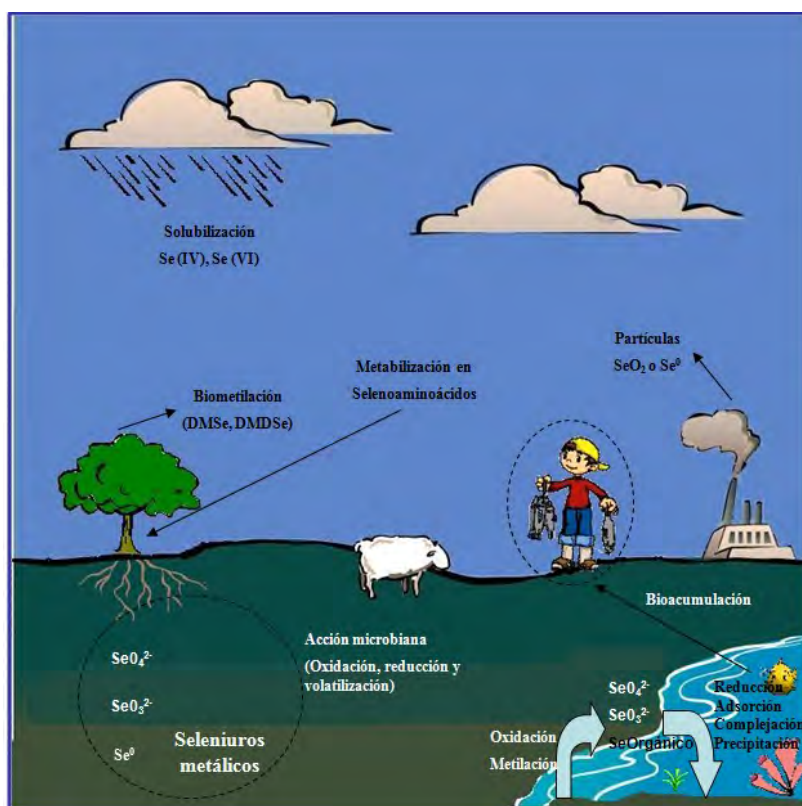


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del selenio

1.3 ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD DEL SELENIO

El interés en la investigación del selenio ha aumentado considerablemente²⁴ a partir del descubrimiento de su carácter esencial en 1957 como elemento traza esencial en la prevención de la necrosis del hígado en animales deficientes en vitamina E²⁶.

El selenio fue identificado en 1973 como un importante componente de la glutathion peroxidasa (GPx), se trata de un tetrámero con cuatro átomos de selenio por molécula. GPx forma parte del mecanismo de defensa intracelular contra el daño oxidativo²⁵.

En los años 80 se descubrieron otras selenoproteínas que indican que el selenio, aparte de tener un papel en la actividad antioxidante también está implicado en otros aspectos del metabolismo de los mamíferos²⁶.

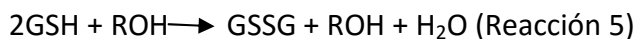
Selenoproteínas

Todas las selenoproteínas de mamíferos contienen selenio en forma del seleno-aminoácido selenocisteína (SeCys) el cual está codificado por el triplete UGA²⁷.

Las selenoproteínas se pueden dividir en 2 grupos dependiendo de la localización en que se encuentre la SeCys. El grupo I es el más abundante e incluye las proteínas donde la SeCys está localizada en la posición N-terminal. A este grupo pertenecen las isoformas de la GPx, la selenoproteína P y la selenoproteína W. El grupo II se caracteriza por la presencia de SeCys en la posición C-terminal y este incluye la tioredoxina reductasa²⁷. A continuación se describen las funciones esenciales de algunas de las selenoproteínas más importantes y que aparecen resumidas en la Tabla 2:

Glutation peroxidasa (GPx)

La enzima glutatión peroxidasa engloba a una familia de múltiples isoenzimas que catalizan la reducción de H₂O₂ o hidroperóxidos a agua y a los correspondientes alcoholes usando glutatión reducido (GSH) como sustrato²⁸:



En los tejidos de mamíferos hay cuatro GPx (1-4) principales y todas ellas conteniendo selenocisteína en su sitio activo.

GPx1, la cual se encuentra en la mayoría de los tejidos, consiste en cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un átomo de selenio. El nivel de GPx1 en la mayoría de los tejidos decrece considerablemente bajo condiciones severas de deficiencia de selenio, actuando como un bioindicador del estatus de selenio en el organismo²⁹.

La enzima glutatión peroxidasa gastrointestinal (GPx2), que consiste en cuatro subunidades, se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal, en el hígado y en las células mamarias. Las funciones de esta enzima son proteger de los peróxidos lipídicos y reducir la susceptibilidad al cáncer de colon²⁹.

La enzima glutatión peroxidasa extracelular, GPx3, es una proteína tetramérica que se produce principalmente en el riñón y se secreta al medio extracelular. Otros tejidos como el pulmón, corazón, glándula tiroidea, placenta y glándulas mamarias

también producen GPx3 pero en menor medida. Esta isoenzima también se encuentra en fluidos extracelulares como sangre, plasma, leche, líquido amniótico y humor acuoso. Como la concentración de GSH en el plasma es muy baja GPx3 puede usar otro donador de electrones como la tiorredoxina²⁹.

La enzima fosfolípido hidroperóxido glutathion peroxidasa, GPx4, cataliza la reducción de los fosfolípidos hidroperóxidos y se expresa en varios tejidos. A diferencia de las anteriores isoenzimas se trata de un monómero implicado en procesos de inflamación y señalización²⁹.

Existen otras dos isoenzimas GPx5 y GPx6 identificadas en mamíferos, ambas muy relacionadas con GPx3. GPx5 no tiene selenocisteína en su punto activo y es secretada en el epidídimo²⁸. GPx6 es una selenoproteína en humanos que contiene cisteína en su punto activo, y se encuentra en el epitelio olfativo²⁸.

La isoenzima GPx7 al igual que GPx4 es una fosfolípido hidroperóxido y contiene cisteína en su punto activo. GPx7 juega un papel fundamental en el cáncer de pulmón reduciendo el estrés oxidativo generado por el metabolismo de los ácidos grasos poli-insaturados²⁸.

Selenoproteína P (Se-P)

Se-P es la principal selenoproteína presente en el plasma. Se-P participa en la defensa antioxidante del espacio extracelular y también es la responsable de transportar el selenio desde el hígado al resto de tejidos²⁷. Es capaz de reducir peroxinitritos y fosfolípidos hidroperóxidos, además es capaz de formar complejos con cadmio y mercurio, y puede estimular la supervivencia de las células nerviosas en cultivo²⁹. Los pacientes enfermos de cirrosis tienen una baja concentración de Se-P en plasma y es debido a que el hígado dañado afecta a la síntesis de Se-P²⁷.

Selenoproteína W y R (Se-W y Se-R)

Se-W es una selenoproteína de bajo peso molecular (87 aminoácidos) conteniendo un residuo de SeCys y existe en cuatro isoformas. Una de las isoformas posee un enlace con el glutathion (GSH) en una de las cisteínas indicando así que una de las funciones de Se-W podría estar relacionada con funciones redox²⁷.

Se-R contiene SeCys en la posición C-terminal parece que su función está relacionada con el estrés oxidativo²⁷, reduciendo los grupos sulfóxidos de las metioninas (metionina-R-sulfoxido reductasa)³⁰.

Tiorredoxina reductasa (TrxR)

TrxR cataliza la reducción principalmente de tiorredoxina, pero en mamíferos también es capaz de reducir otros sustratos, como por ejemplo la vitamina C. Tiorredoxina cataliza la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas y también está involucrada en varios procesos vitales, como la síntesis de ADN y la regulación del proceso de apoptosis. Hay varias isoformas de TrxR. TrxR1 y TrxR2 se encuentran localizadas en la mitocondria y en el citosol, respectivamente. La tercera isoforma, tiorredoxina/glutation reductasa (TGR), se expresa en pequeñas cantidades en varios tejidos, pero principalmente en los testículos²⁹.

Iodotironina deiodinasa (DI)

La familia de la iodotironina deiodinasa consiste en tres enzimas, iodotironina deiodinasa 1, 2 y 3 (DI1, DI2, DI3), las cuales catalizan la eliminación de los grupos de yodo presentes en las hormonas tiroideas, con el objetivo de activarlas o desactivarlas²⁹.

Tabla 2. Funciones y distribución en los tejidos de las selenoproteínas

Selenoproteínas	Distribución en los tejidos	Funciones
Familia de la Glutation peroxidasa (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7)	Ubicua (GPx1, GPx4), gastrointestinal (GPx2), plasma y riñón (GPx3), epitelio nasal, glándula de Bowman (GPx6)	Antioxidante, modulación de lipooxigenasas, transducción de la señal redox
Familia de la Tiorredoxina reductasa (TRx1,2,3; TGR)	Mitocondria (TRx1) Citosol (TRx2) Testículos (TRx3)	Múltiples papeles en la regulación redox, metabolismo de drogas, transducción de señal
Familia de la Yodotironina deiodinasa (Dio1,2,3)	Tiroides, riñón, hígado y pituitaria	Cataliza la conversión de T4 a T3 y la degradación de rT3 (Dio1 y Dio2) y la degradación de T4 y T3 (Dio1 y Dio3)
Selenofosfato sintetasa 2 (SPS2)	Varios tejidos	Cataliza la producción de selenofosfato
Selenoproteínas 15 y 18 KDa (Sel15, Sel18)	Varios tejidos, cerebro	Antioxidante en células secretoras (Sel15) Reserva de Selenio (Sel18)
Selenoproteína M (SelM)	Varios tejidos, cerebro	Defensa contra el estrés oxidativo Regulación de calcio
Selenoproteína N (SelN)	Músculo esquelético, hígado, cerebro, corazón, estómago	Proliferación celular y regeneración?

Selenoproteína P (SeIP)	Principalmente en el hígado	Transporte de Se, antioxidante
Selenoproteína R (SeIR, MsrB)	Varios tejidos incluyendo al cerebro	R-metionina-sulfóxido-reductasa
Selenoproteína T (SeIT)	Varios tejidos	Regulación de calcio
Selenoproteína W (SeIW)	Principalmente en el músculo esquelético, corazón, cerebro, testículos, bazo	Funciones redox
Selenoproteína I	Varios tejidos	CDP-álcohol fosfotiltransferasa

Efectos de la deficiencia de selenio

El Selenio, al ser un elemento traza esencial, su deficiencia en la dieta produce serios efectos en la salud humana.

Se ha identificado deficiencia de selenio en aquellos lugares con una baja concentración en el suelo, como por ejemplo en regiones volcánicas³¹. Los suelos ácidos y la formación de compuestos de coordinación del selenio, fundamentalmente con hierro y aluminio, reducen la asimilación de selenio por parte de las plantas. Las regiones áridas de Australia, noreste de China, norte de Corea del Norte, sur central de China, Nepal y Tíbet, y África Central son zonas en las cuales el contenido de selenio es notablemente bajo²⁷.

En los años 50, se identificaron síntomas de la deficiencia de selenio en el ganado, ocasionando anomalías en la reproducción y en el crecimiento. También se observó que sus crías padecían la enfermedad del músculo blanco, una miopatía del corazón y del músculo esquelético³¹.

En China y en Siberia del Este la población padece la enfermedad de Keshan. Esta enfermedad, causada por la deficiencia de Selenio, se trata de una cardiomiopatía endémica que afecta principalmente a niños de entre 2 y 10 años y en algunos casos en mujeres de edad fértil³². Esta cardiomiopatía se ha relacionado con el virus llamado "Coxsackie" el cual se hace muy virulento cuando los niveles de Selenio son bajos.³² Bajos niveles de Selenio pueden ocasionar un tipo de osteoartritis conocida con el nombre de enfermedad de Kashin-Beck, la cual ocasiona desórdenes graves en el desarrollo óseo, produciendo deformaciones en las articulaciones y generando debilitamiento muscular³². Ambas enfermedades han podido ser controladas y prácticamente revertidas mediante la suplementación de selenio³².

La deficiencia de selenio está relacionada con la pérdida de la inmunocompetencia puesto que el selenio se encuentra presente en cantidades significativas en tejidos inmunes como el hígado, el bazo y los nodos linfáticos. Además, se ha demostrado que la suplementación con selenio tiene efectos inmunoestimulantes³¹.

La virulencia y la progresión de ciertas enfermedades causadas por infecciones virales también se han relacionado con un bajo contenido en selenio. Beck *et al.* confirman que en pacientes con deficiencia en selenio, los virus inofensivos se podían convertir en virulentos³³. El selenio es un potente inhibidor de la replicación del virus VIH *in vitro*³⁴. En esa misma línea, Baum *et al.* comprobaron que pacientes con el virus del VIH y con deficiencias en los niveles de selenio, tenían posibilidades de morir por causas relacionadas con el VIH 20 veces superior a las de aquellos pacientes con niveles normales de dicho elemento³⁵. El selenio parece tener un papel protector en individuos infectados con el virus de la hepatitis (B o C) evitando así su progresión hacia el cáncer de hígado^{36,37}.

Así mismo, se han correlacionado problemas de reproducción con estados carenciales de selenio. Barrington *et al.* encontraron bajos niveles de selenio en mujeres que habían sufrido abortos^{38,39}. Además, se ha demostrado que el selenio resulta esencial para la fertilidad masculina, ya que participa en la síntesis de testosterona y en el desarrollo normal de los espermatozoides⁴⁰. Un suplemento de 100 µg de selenio al día durante 3 meses a hombres subfértiles produjo un aumento de la motilidad del espermatozoides⁴⁰. El 11% de los hombres que recibieron el suplemento fueron capaces de procrear, mientras que no se detectó diferencia en los que recibieron placebo⁴¹.

Las siguientes evidencias demuestran que el selenio es importante para el cerebro:

- La regeneración de los neurotransmisores se altera durante los estados carenciales de selenio⁴².
- Ante una disminución de los niveles de selenio el cerebro recibe un suplemento prioritario⁴³.
- La suplementación con selenio reduce los ataques epilépticos en niños^{44,45}.

- Niveles de selenio en plasma bajos están asociados con la senilidad y la pérdida cognitiva en la gente mayor^{43,46}.
- La concentración de selenio en el cerebro de los pacientes con Alzheimer es un 40% inferior de los que no padecen Alzheimer⁴³.
- El cerebro es deficiente en catalasa, lo que implica que el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos deben ser eliminados mediante las selenoenzimas antioxidantes⁴⁵.

Se han realizado estudios que han permitido relacionar un bajo contenido en selenio con una elevada incidencia de depresión, ansiedad y confusión^{43,47,48}.

Por último cabe mencionar que los bajos niveles de selenio se han asociado con enfermedades cardiovasculares⁴⁹, infartos de miocardio³², aumento del estrés oxidativo⁵⁰, aparición de inflamaciones (artritis reumatoide⁵¹, pancreatitis⁵² y asma^{53,54,55}) y además afecta a la función tiroidea agravando el hipotiroidismo⁵⁶.

Efectos tóxicos del selenio

El estrecho intervalo de concentración para que el selenio sea considerado como tóxico y/o esencial hace que su contenido en la dieta deba controlarse⁵⁷. De hecho, la cantidad diaria recomendada ("Recommended Dietary Allowance", RDA) tanto para hombres y mujeres son 55 µg/día, mientras que el límite superior tolerable de ingesta ("Tolerable Upper Intake Level", UL) son 400 µg/día³². Aun así, existe cierta controversia en lo que a la toxicidad del selenio se refiere. Jacobs y Frost observaron que el selenio era tóxico a niveles de 8-10 µg mL⁻¹. Por otro lado, otro estudio demostró⁵⁸ que el consumo de selenio en una dosis de 1510 µg/día no mostraba signos de toxicidad. Un estudio reveló que la ingesta de 3200-5000 µg/día de selenio presentaba síntomas de toxicidad⁵⁹. Esto es debido a que los efectos tóxicos del selenio dependen del compuesto de selenio presente (los compuestos orgánicos de selenio son menos tóxicos que sus especies inorgánicas), de su forma de administración, de la especie animal, del tiempo de exposición, del estatus fisiológico así como de su interacción con otros metales³².

Ya en el clásico libro de viajes de Marco Polo, del siglo XIII, se describe detalladamente una enfermedad que afectaba a los animales de carga al pastar en

ciertas regiones desérticas de China, como consecuencia de la ingestión de ciertas plantas venenosas. En el siglo XIX se han descrito síntomas similares en la caballería estadounidense durante la conquista del Oeste americano⁶⁰

La toxicidad producida por el selenio puede ser aguda o crónica. Los síntomas de una toxicidad aguda por selenio traen consigo dolor de cabeza, mareos, disnea, fatiga, náuseas, vómitos, aliento a ajo, gusto amargo en la boca e irritación de las membranas mucosas de los ojos y del tracto respiratorio superior. Mientras que los síntomas de una toxicidad crónica (selenosis) provocan depresión, nerviosismo, mareos, inestabilidad emocional, dermatitis, aliento a ajo, sudores, problemas gastrointestinales, exceso de caries y, en casos extremos, pérdida de pelo y uñas⁵⁹

El Selenio como anticancerígeno

Varios estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto una relación inversa entre los niveles de selenio y el riesgo de cáncer. En un estudio realizado por Clark et al.⁶¹ se observó que aquellas personas que habían sido suplementadas con levadura selenizada, predominantemente en forma de selenometionina (200 µg/día), su mortalidad por cáncer disminuía en un 50%. También se observó una disminución en la incidencia del cáncer de próstata, pulmón y colon.

Otro de los estudios que relacionan el selenio con el cáncer es el denominado SELECT. En este estudio se empleó selenio y vitamina E, tanto de forma conjunta como por separado, para prevenir el cáncer de próstata. El ensayo se realizó sobre 32400 norteamericanos en el periodo de 2001 a 2013^{62,63}. De los resultados de este estudio se concluyó que no existe ningún efecto entre la vitamina E y el selenio en el cáncer de próstata⁶⁴.

Todo lo anterior pone de manifiesto que existen discrepancias sobre el selenio y su actividad anticarcinogénica, lo que indica que se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos del selenio en relación con el cáncer, aún así se han postulado diversas hipótesis con el objeto de establecer el mecanismo de actuación del Se frente al cáncer.

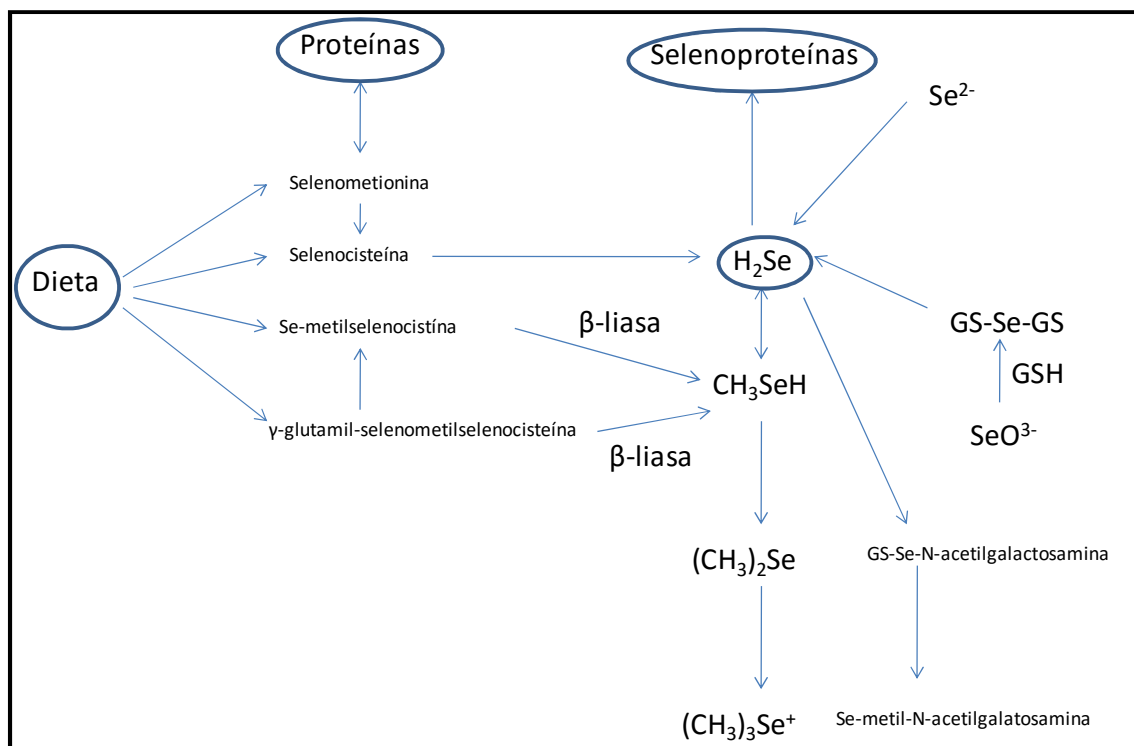


Figura 3. Diagrama del metabolismo del selenio

El efecto protector del selenio frente al cáncer depende de la forma química en que este se suministre, ya que los compuestos de selenio pueden metabolizarse por diferentes vías (Ver Figura 3). Los experimentos *in vitro* indican que los compuestos metilados de selenio son más eficientes en la protección del cáncer ya que son capaces de producir metilselenol. Los compuestos metilados de selenio modifican varios procesos biológicos incluyendo la supresión de la angiogenesis⁶⁵ y la prevención del cáncer⁶⁶. Se-metilselenocisteína, γ-glutamyl-Se-metilselenocisteína son compuestos capaces de producir metilselenol a través de una reacción catalizada por β-liaza (Ver Figura 3). En estudios relacionados con la protección del selenio frente al cáncer se ha puesto de manifiesto que las plantas acumuladoras de selenio, como el ajo y el brócoli, poseen un efecto beneficioso que puede atribuirse a la presencia de aminoácidos metilados (Se-metilselenocisteína, γ-glutamyl-Se-metilselenocisteína). Se-metilselenocisteína es uno de los selenocompuestos más importantes con actividad quimiopreventiva, resultando 2 veces más activa que la selenometionina en la supresión de cáncer de mama en roedores⁶⁶. El ácido metilselénico es otros de los compuestos que es capaz de producir metilselenol. En experimentos *in vitro* se ha comprobado que el ácido metilselénico bloquea la progresión del ciclo celular, induce

apoptosis en las células cancerígenas e inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos, sin los cuales los tumores no pueden crecer o metastatizar⁶⁷.

El selenio es capaz de actuar como agente pro-oxidante, por lo que, los compuestos con estado de oxidación (IV), son los agentes anti-cancerígenos más efectivos, ya que son capaces de inactivar enzimas oxidando los grupos sulfhidrilo y provocando así apoptosis⁶⁸.

El efecto antioxidante del selenio y su capacidad de reducir el estrés oxidativo y el daño al ADN⁵⁰ ha sido otro de los mecanismos propuestos. De hecho, una ingesta adecuada de selenio es muy importante cuando la actividad de otros antioxidantes u otras enzimas antioxidantes es baja⁶⁷.

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y MECANISMOS DE DEFENSA

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) forma parte del metabolismo normal de una célula, pero el desequilibrio entre su generación y su neutralización puede conducir a un estado de estrés oxidativo⁶⁹. Las células poseen mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo: enzimáticos (glutathion peroxidasa, glutathion reductasa y glutathion-S-transferasa), no-enzimáticos (glutathion reducido, y algunos compuestos de selenio).

2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). El anión superóxido y el radical hidroxilo son radicales sumamente reactivos, capaces de oxidar indiscriminadamente muchas estructuras biológicas dañándolas. El daño oxidativo que estas especies pueden producir en las macromoléculas biológicas se asocia a numerosas patologías de consecuencias graves. Su reacción se produce con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos en el interior de las células y con componentes de la matriz extracelular. El estrés oxidativo producido por ROS se relaciona con varias enfermedades incluyendo el envejecimiento⁷⁰, cáncer^{70,71}

enfermedades degenerativas como Parkinson y Alzheimer⁷²⁻⁷⁵ y enfermedades cardiovasculares como arterioesclerosis⁷⁶⁻⁷⁹.

Las especies reactivas de oxígeno se generan, principalmente, durante la reducción del oxígeno molecular (O_2) para producir agua (H_2O) a través de un proceso metabólico (fosforilación oxidativa) catalizado por la enzima citocromo oxidasa (Ver Figura 4). La formación de las especies reactivas de oxígeno y su metabolismo aparecen resumidas en la Figura 5. A continuación se describen brevemente las principales especies reactivas de oxígeno en términos de mecanismos de formación y sus efectos celulares:

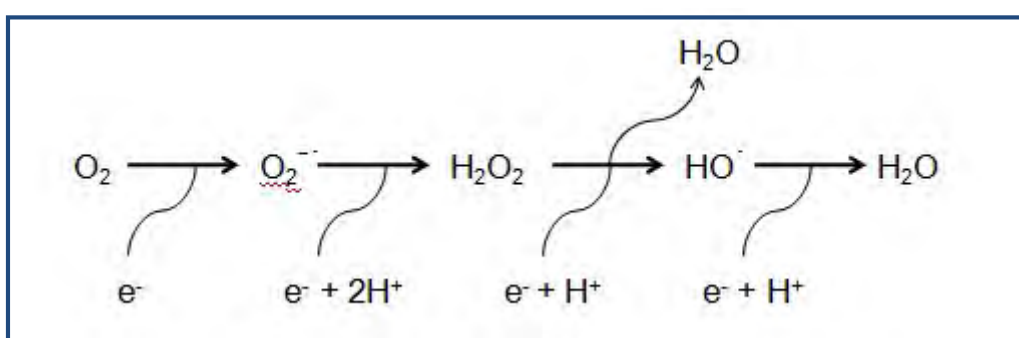


Figura 4. Reducción univalente del oxígeno molecular

Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

El anión superóxido se produce a partir del oxígeno molecular por la adición de un electrón, aún siendo un radical libre no es altamente reactivo. No es capaz de penetrar a través de las membranas lipídicas lo que significa que el anión superóxido se va a encontrar localizado en el compartimento que se genere. La formación de superóxido tiene lugar espontáneamente, especialmente en ambientes aeróbicos en la membrana mitocondrial interna durante la cadena respiratoria (Fig. 4). El superóxido (y el peróxido de hidrógeno) también se produce endógenamente por las flavoenzimas⁸⁰. Otras enzimas capaces de producir superóxido son la lipooxigenasa y la ciclooxygenasa^{81,82}. La enzima NADPH oxidasa de las células fagocíticas es un ejemplo de producción deliberada de superóxido a partir de la reducción del oxígeno. Enzimas similares a la NADPH oxidasa también están presentes en células no fagocíticas⁸³. Por otro lado, existen mecanismos de defensa frente al anión superóxido: dos moléculas de superóxido rápidamente dismutan a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 no es un radical libre, pero es altamente reactivo ya que tiene la habilidad de penetrar a través de las membranas biológicas y además es capaz de producir más especies reactivas de oxígeno como el ácido hipocloroso (HClO) (Reacción 1) catalizada por la enzima mieloperoxidasa, que se encuentra presente en los fagosomas de los neutrófilos⁸⁴ y, la más importante, formación del radical hidroxilo ($OH\cdot$) a través de la oxidación de los metales de transición (Reacción 2).

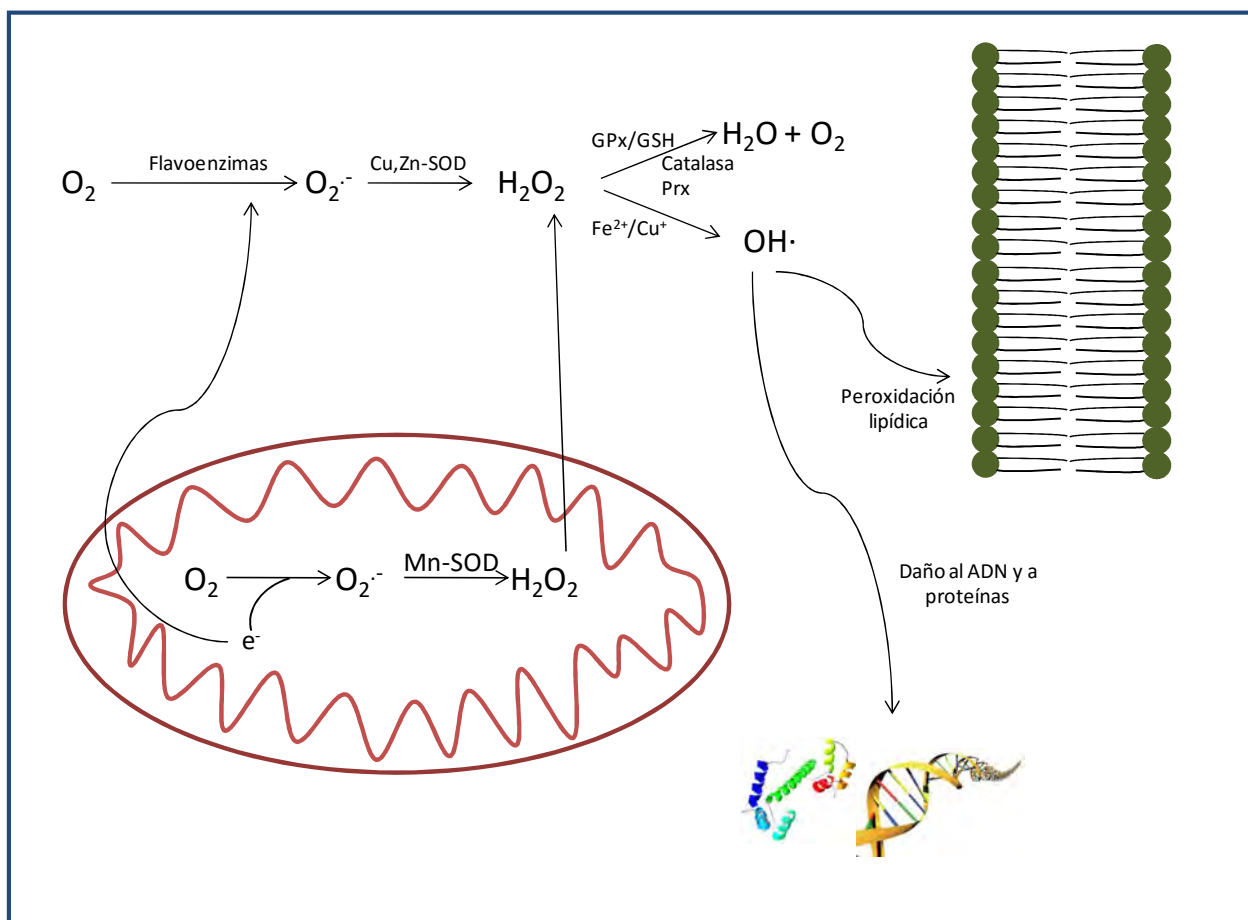


Figura 5. Esquema simplificado de los sistemas oxidativos y antioxidativos celulares (adaptado de Nordberg et. al.⁸⁵)

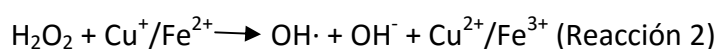


El H_2O_2 también tiene un papel importante en la señalización intracelular^{86,87}.

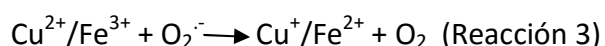
Una vez producido el H_2O_2 , éste se puede eliminar por la acción de las enzimas antioxidantes: catalasa, glutathion peroxidas y peroxirredoxinas (Fig. 2)^{88,89,90}.

Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

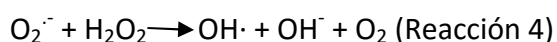
Debido a su elevada reactividad con biomoléculas, el radical hidroxilo se considera una de las especies reactivas de oxígeno más dañinas. El radical hidroxilo se forma a partir de peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} o Cu^+) conocida como la reacción de Fenton:



El anión superóxido también juega un papel importante ya que es capaz de reciclar los metales que se han producido en la reacción de Fenton:



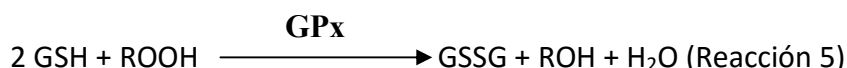
A partir de las reacciones 2 y 3 se obtiene la reacción de Haber-Weiss, donde los metales de transición juegan un importante papel en la formación de radicales hidroxilo^{91,92}:



2.2 SISTEMAS DE DEFENSA ENZIMÁTICOS

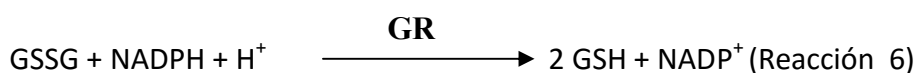
Glutathion peroxidasa (GPx)

La glutathion peroxidasa actúa junto a las moléculas de glutathion reducido (GSH) presentes en las células en altas concentraciones (micromolar). El sustrato para esta reacción catalítica puede ser H_2O_2 o ROOH ⁶⁹. La GPx descompone los peróxidos en agua (o alcohol) y simultáneamente oxida la molécula de GSH a glutathion oxidado (GSSG):



Glutation reductasa (GR)

La glutatión reductasa (GR), con una masa molecular de 120 kDa, está constituida por dos subunidades proteicas y se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria⁹³. Esta enzima cataliza la reacción que restaura el glutatión a su forma reducida a expensas de equivalentes reductores en forma de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH). Esta restauración del contenido de GSH es esencial para eliminar el H₂O₂ y evitar la acumulación de GSSG, que es muy tóxico para la célula⁹³:



Glutation-S-transferasa (GST)

La glutatión-S-transferasa (GST) incluye a toda una familia de proteínas que utilizan el GSH para la detoxificación de una gran cantidad de compuestos, incluyendo carcinogénicos, fármacos y productos derivados del estrés oxidativo. Se han descrito tres familias principales de GST en humanos dependiendo de su localización celular: citosólica, mitocondrial y microsomal unida a membrana.

2.3 SISTEMAS DE DEFENSA NO ENZIMÁTICOS

GLUTATION reducido (GSH)

El glutatión reducido es la principal defensa antioxidante no enzimática presente en las células, es un tripéptido compuesto por L-glutámico, L-cisteína y glicina (γ-glutamyl-cysteinyl-glicina) que actúa reduciendo diferentes peróxidos, hidroperóxidos y radicales⁹⁴ mediante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa.

3. MERCURIO

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MERCURIO

El mercurio es un elemento químico que a temperatura ambiente es un metal líquido de color plateado. Su símbolo “Hg” se deriva de la palabra griega hydrargyros,

la cual significa "agua plateada"⁹⁵. Los romanos llamaron al mercurio "Argentum Vivum", que significa "Quick Silver" o "plata líquida" debido a que era el único elemento conocido líquido a temperatura de ambiente.

Se reconoció por primera vez como elemento por el químico francés Antoine Laurent Lavoisier en sus experimentos sobre la composición del aire⁹⁶.

El mercurio (Hg), es un elemento metálico, de color plateado que permanece en estado líquido a temperatura ambiente. Su número atómico es de 80 y es uno de los elementos de transición del sistema periódico^{96,97}.

A temperatura ambiente, el mercurio es un líquido brillante, denso, de color blanco plateado. Es ligeramente volátil a temperatura ambiente, y se solidifica a una presión de 7,640 atmósferas (5,800,000 mm Hg). Se disuelve en ácido nítrico y en ácido sulfúrico concentrados, pero es resistente a los álcalis. Tiene un punto de fusión de -39 °C, un punto de ebullición de 357 °C y una densidad relativa de 13.5. Su masa atómica es 200.59^{96,97}.

Se presenta en la naturaleza bajo diferentes modalidades, ya sea en forma metálica, de vapor o gas, combinado con otros elementos (como cloro, azufre y oxígeno) para formar sales inorgánicas, o bien formando compuestos orgánicos (como el metilmercurio o el fenilmercurio), los cuales también pueden presentarse en forma de sales a través de procesos naturales, en los que pueden intervenir microorganismos: el mercurio inorgánico puede ser transformado en mercurio orgánico⁹⁶.

Forma sales en dos estados de oxidación: Hg(I) y Hg(II). Las sales de Hg(II) o mercúricas son mucho más comunes que las sales de Hg(I). La mayoría de los compuestos inorgánicos de mercurio son polvos blancos o cristalinos, excepto el sulfuro de mercurio (también conocido como cinabrio) que es rojo y se torna blanco al exponerse a la luz⁹⁶.

El mercurio también forma compuestos organometálicos. Éstos se caracterizan por la unión del mercurio a uno o dos átomos de carbono para formar compuestos del tipo: RHgX y RHgR' , en donde R y R' representan el sustituyente orgánico o cadenas de carbonos de longitud variable. Cabe destacar que el enlace carbono-mercurio es químicamente estable y no se rompe en presencia de agua ni ácidos débiles o bases. La

estabilidad no se debe a la fuerza del enlace carbono-mercurio sino a la poca afinidad del mercurio por el oxígeno (OPS 1978)⁹⁸.

3.2 ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO AMBIENTE

Atmósfera

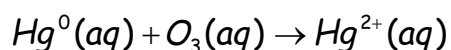
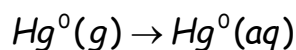
Las emisiones de Hg, su transformación transporte y finalmente su deposición son los factores más relevantes en la presencia de este elemento en el medio ambiente.

La emisión puede tener como origen procesos naturales o antropogénicos. Entre los primeros, se encuentran la volatilización del mercurio desde medios acuáticos y marinos, la volatilización a partir de la vegetación, la liberación de materiales geológicos y las emisiones volcánicas. Es importante señalar que las emisiones naturales de mercurio tienen lugar principalmente en forma de mercurio elemental. En cuanto a las emisiones antropogénicas, éstas mayoritariamente se deben a procesos industriales y fuentes de combustión de contenido variable en mercurio, pudiendo darse tanto en forma gaseosa como particulada.

El mercurio que se encuentra en la atmósfera está en su mayor parte (>95 %) como vapor metálico (Hg^0)⁹⁹. El resto del mercurio se encuentra en la forma de Hg^{2+} tanto como precipitado unido a partículas de polvo como, en menor medida, en forma gaseosa.

Una vez liberado a la atmósfera, su tiempo de residencia varía en función de la forma en la que se encuentre. Así, el Hg^0 tiene un tiempo de residencia medio de alrededor de un año, mientras que el Hg^{2+} tiene tiempos de residencia que oscilan entre horas y meses, ya que se puede depositar con relativa facilidad tanto por vía húmeda como por vía seca¹⁰⁰.

Las reacciones de transformación entre estas especies son las que rigen de un modo general la distribución y deposición del mercurio. El principal mecanismo de transformación entre especies es la oxidación del Hg^0 por el ozono (O_3), que ocurre mayoritariamente en las gotas de agua de las nubes¹⁰¹:



Suelos

Las especies de Hg^{2+} depositadas en el suelo están sujetas a un amplio abanico de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, contenido en ácidos húmicos...) son normalmente favorables para la formación de compuestos inorgánicos de Hg^{2+} y compuestos de coordinación con compuestos orgánicos¹⁰².

Aunque algunos compuestos inorgánicos Hg^{2+} son bastante solubles (y en consecuencia con elevada movilidad), suelen formar complejos con la materia orgánica (especialmente con ácidos fúlvicos y húmicos) y arcillas de los suelos. Este comportamiento limita en gran medida la movilidad del mercurio en los suelos.

Una parte del Hg^{2+} puede sin embargo interaccionar con ligandos orgánicos solubles u otras formas de carbono orgánico disuelto (DOC) facilitando su partición hacia la fase acuosa.

El metilmercurio es otra especie de mercurio que se encuentra presente en proporciones muy pequeñas en suelos y sedimentos, pero cuya presencia es de gran importancia debido a su toxicidad y capacidad de bioacumulación. Su formación se debe al efecto de varios procesos microbianos en presencia de compuestos de Hg^{2+} . Su proporción media respecto al total de mercurio presente en suelos y sedimentos suele ser inferior al 1%. Como en el caso de las especies de Hg^{2+} , el metilmercurio presenta una gran afinidad por la materia orgánica, hecho que limita su movilidad en el medio ambiente.

Aguas

El mercurio que llega al agua lo hace fundamentalmente como Hg^{2+} ; el metilmercurio que entra lo hace a través de precipitaciones y en concentración muy baja (0.15 ng l^{-1})¹⁰³. Estos compuestos pueden ser asimilados por las especies biológicas presentes en el medio, precipitar bajo formas químicas diversas en los sedimentos o reducirse a mercurio vapor y vaporizarse para volver nuevamente a la atmósfera. Estas transformaciones dependen de diversos factores medioambientales

como la actividad microbiana, la temperatura, disponibilidad de carbono orgánico, la presencia de partículas en suspensión, el oxígeno disuelto y el pH.

Como en los suelos, la química del mercurio viene determinada por las diferentes variables biológicas, físicas y químicas de las aguas. Por ello, hay que tener en cuenta las condiciones existentes en las aguas superficiales que hacen diferentes las especies de mercurio presentes en aguas continentales (ríos, lagos, arroyos), en aguas oceánicas y también en los estuarios y costas de los océanos que son fases intermedias entre las otras dos.

En las aguas dulces superficiales de áreas no contaminadas, el mercurio se encuentra en concentraciones de $1\text{-}20\text{ ng l}^{-1}$ y se distribuye en varias formas químicas: mercurio elemental que es volátil pero poco reactivo, especies mercúricas y mercurio orgánico, principalmente metilmercurio (MeHg^+), dimetilmercurio (Me_2Hg), y etilmercurio (EtHg^+) en baja concentración. La distribución de este metal entre la fase acuosa, las fases coloidales y las partículas en suspensión varía espacial y temporalmente. En general, la concentración de Hg^0 es mayor cerca de la interfase aire-agua mientras que los niveles de Hg^{2+} y MeHg^+ son más elevados en la proximidad de los sedimentos.

En las aguas dulces continentales no contaminadas, el Hg^{2+} no se encuentra como ion libre sino formando complejos con OH^- ($\text{Hg}(\text{OH})^+$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$, $\text{Hg}(\text{OH})_3^-$), mientras que en estuarios y océanos los clorocomplejos (HgCl^+ , HgClOH , HgCl_2 , HgCl_3^- , HgCl_4^{2-}) son las especies predominantes. En ambientes anóxicos que contengan sulfuro, el mercurio se combina para formar el precipitado de sulfuro (HgS)¹⁰⁴. También en disolución en presencia de sulfuro, se encuentran los complejos de sulfuro (HgS_2H_2 , HgS_2H^- y HgS_2^{2-}) como mayoritarios¹⁰⁵. Además, una fracción de Hg^{2+} es probable que se encuentre unida a los ácidos húmicos. Las reacciones del ion mercúrico son relativamente rápidas y se cree que en ellas existen varias especies en equilibrio incluidas aquellas unidas a material particulado.

El metilmercurio se comporta en términos químicos igual que el mercurio inorgánico, encontrándose principalmente unido a partículas y a la materia orgánica disuelta¹⁰⁶. El complejo con cloruro (CH_3HgCl) en el medio marino y el hidroxocomplejo neutro (CH_3HgOH) en aguas continentales son mayoritarios¹⁰⁷. En presencia de sulfuro

se forma el CH_3HgS^- , pero éste tiene menos importancia que los complejos sulfúricos del mercurio inorgánico.

En el océano las especies organomercuriales se generan por debajo del termoclinae, a profundidades comprendidas entre los 300-500 m en las que los niveles de oxígeno son inferiores a $100\ \mu\text{M}$. En cambio, la transformación y eliminación de estas especies tiene lugar en las aguas superficiales.

3.3 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO

El mercurio se desplaza constantemente en el medio ambiente a través de su ciclo biogeoquímico. Las seis etapas más importantes son:

- Desgasificación del mercurio de las rocas, del suelo, de la superficie de las aguas, o de las emisiones de los volcanes y las actividades antropogénicas.
- Movimiento de las especies gaseosas en la atmósfera
- Deposición del mercurio en los suelos y en la superficie del agua
- Conversión del elemento en sulfuros insolubles
- Precipitación o bioconversión en formas más volátiles o más solubles como el metilmercurio.
- Re-emisión a la atmósfera o bioacumulación

La movilidad del mercurio en el medio ambiente depende mucho de la forma química en que se encuentre presente. El Hg^0 en forma de vapor puede ser transportado largas distancias antes de depositarse en el suelo. Normalmente, la deposición ocurre por precipitación (lluvia, nieve...)

El mercurio presente en las aguas se puede transformar fácilmente a metilmercurio, una especie más tóxica y con capacidad de bioacumularse. En la Figura 4 se muestra esquemáticamente el ciclo del mercurio en el medio ambiente.

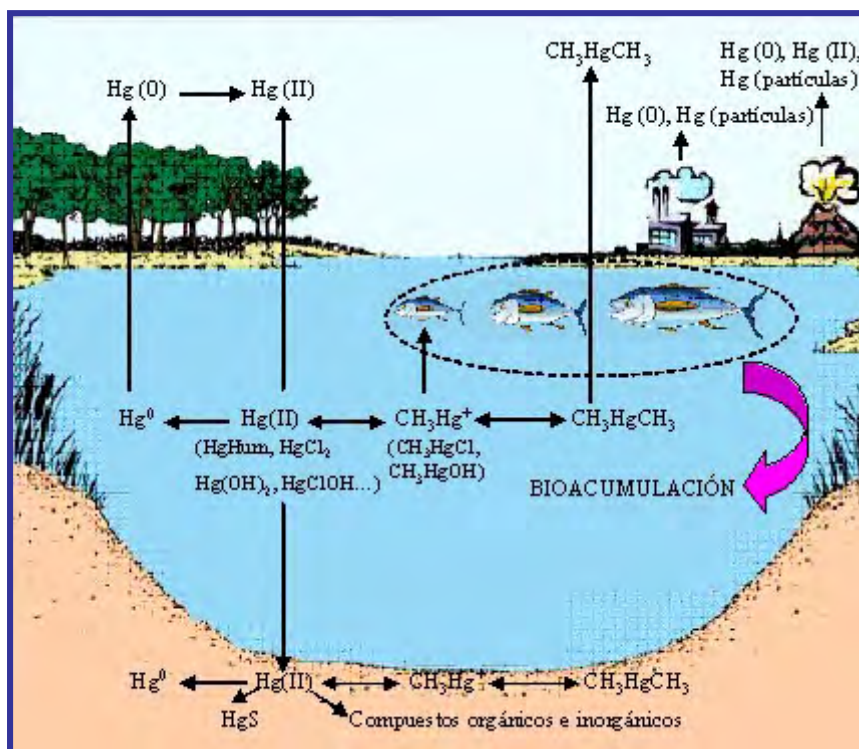


Figura 4. Ciclo biogeoquímico del mercurio

3.4 TOXICIDAD DEL MERCURIO

La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, su sintomatología varía según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio, o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular sales de metilmercurio y etilmercurio, y el dimetilmercurio). En cuanto a las fuentes de exposición, los compuestos de alquilmercurio, de los cuales el metilmercurio es, con mucho, el más importante, la fuente de exposición más significativa es la dieta, particularmente a base de pescados y mariscos. En el caso del vapor de mercurio elemental, la fuente más importante para la población en general son las amalgamas dentales, pero a veces la exposición en el ambiente de trabajo puede ser más significativa. En lo que respecta a los compuestos inorgánicos de mercurio, los alimentos constituyen la fuente más importante para la mayoría de la gente. Sin embargo, para ciertos segmentos de la población, el uso de cremas y jabones a base de mercurio para aclarar la piel, y el uso de mercurio con propósitos culturales/rituales o en medicina tradicional, también puede conducir a la exposición a mercurio inorgánico o elemental.

Mercurio elemental

No se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, pero si en los pulmones, de hecho las tasas de absorción de vapor de mercurio a través de los pulmones pueden acercarse al 80 %. El tiempo de vida medio en sangre es alrededor de 60 días. Al ser liposoluble, es capaz de atravesar con facilidad las barreras con el cerebro y la placenta. En los riñones y otros tejidos el Hg^0 se puede oxidar a Hg^{2+} mediante una enzima llamada catalasa^{108,109,110}. La inhalación de vapor de mercurio elemental produce trastornos neurológicos y de comportamiento en humanos . La exposición aguda a niveles elevados de vapor de mercurio ($>1.000 \mu\text{g m}^{-3}$) puede causar neumonía y otros signos de daño pulmonar. Exposiciones más largas a niveles menores ($100 \mu\text{g m}^{-3}$) dan lugar a gingivitis, temblores de manos y eretismo (desordenes de personalidad y psicológicos que incluyen delirio, alucinaciones, cambios de comportamiento, etc.).

Las exposiciones crónicas a niveles más bajos ($25\text{-}100 \mu\text{g m}^{-3}$) están asociadas con síntomas más suaves como temblores casi imperceptibles, irritabilidad, insomnio o lasitud. Paralelamente también se ha observado que produce una disminución en la memoria a corto plazo y en la velocidad de respuesta nerviosa. La exposición a vapor de mercurio en los niveles anteriores produce afecciones renales.

Compuestos inorgánicos

De los compuestos inorgánicos, el catión Hg^{2+} es el que se considera más tóxico. El comportamiento del Hg^{2+} en los seres vivos viene determinada por su elevada afinidad a unirse a los grupos tiol que abundan en los diferentes tejidos, bloqueando de este modo grupos biológicos esenciales. En concreto, se une a los grupos $-\text{SH}$ de los restos del aminoácido cisteína que constituye el centro catalítico activo de determinadas enzimas, por lo que se inhibe su actividad.

El mercurio inorgánico es capaz de absorberse en el tracto gastrointestinal y a través de la piel^{109, 110}.

Una vez incorporado a través del tracto gastrointestinal o la piel, el Hg^{2+} tiende a acumularse en los riñones¹¹¹, mientras que su acumulación en el cerebro y la placenta

son mínimas. Se elimina en su mayor proporción por la orina, teniendo un periodo de residencia medio en el ser humano de unos 42 días¹¹².

La exposición crónica a Hg^{2+} provoca serias deficiencias renales, trastornos psíquicos, fatiga, pérdida de memoria, etc.

Compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos pueden absorberse por ingestión y si se evaporan pueden ser absorbidos por los pulmones. Estos compuestos se absorben muy poco por la piel. Al ser liposoluble puede llegar fácilmente al cerebro y la placenta y aparecer en la leche materna. Se acumulan en el riñón y el sistema nervioso central. El tiempo de vida medio de los compuestos orgánicos de mercurio es alrededor de 70 días¹¹⁰.

Los efectos tóxicos del metilmercurio sobre los seres humanos se conocen a raíz de dos desastres medioambientales que tuvieron lugar en Japón (en la década de los años 50) y en Irak (1971-1972). Las principales patologías que provoca el metilmercurio son deficiencia sensorial y motora, cambios en el comportamiento, ataxia muscular, pérdida de campos visuales y, en menor medida, espasmos que aparecen al continuar la intoxicación¹¹³. El metilmercurio es capaz de producir apoptosis, se trata de la muerte celular programada. En el apartado 5 de la presente memoria se explica en qué consiste este proceso de muerte celular y qué proteínas participan en el proceso de apoptosis. Kunitomo fue el primero en demostrar la capacidad del metilmercurio de inducir apoptosis en cultivos neuronales. El metilmercurio en dosis de hasta $0.3 \mu\text{M}$ produce apoptosis, mientras que a concentraciones superiores el metilmercurio produce la muerte por necrosis¹¹⁴.

La fuente más importante de mercurio para los humanos viene a través del consumo de pescado donde se bioacumula a través de la cadena alimenticia que hace que de concentraciones de ng l^{-1} en aguas se pase a $\mu\text{g g}^{-1}$ en los peces depredadores.

4. INTERACCIÓN MERCURIO-SELENIO

El efecto protector que el selenio ejerce frente a la toxicidad del mercurio se conoce desde hace más de tres décadas siendo descrito por primera vez por Parizek y Ostadalova¹¹⁵. Estos investigadores demostraron la desaparición del efecto tóxico del

mercurio cuando ambos compuestos (SeO_3^{2-} y Hg^{2+}) eran administrados simultáneamente a ratas.

Para una mejor comprensión de este fenómeno, se han estudiado posibles relaciones entre estos dos elementos en animales y humanos ¹¹⁶. Koeman y col. establecieron una relación molar 1:1 de mercurio y selenio en hígados de mamíferos marinos para la prevención del efecto tóxico del mercurio por parte del selenio. La correlación lineal de estos elementos fue también observada en estudios posteriores en humanos tanto expuestos ocupacionalmente al mercurio como no expuestos. La relación equimolar se observó sólo cuando la concentración de mercurio superaba un determinado valor (1-100 mg/kg dependiendo de la especie analizada), lo que sugiere un proceso de desintoxicación en el que el selenio se ve involucrado cuando el mercurio alcanza un determinado nivel.

Los niveles máximos de mercurio y selenio se han encontrado tanto en mamíferos marinos como en aves: 510 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de mercurio y selenio respectivamente, en hígados de focas *Poca hispida*¹¹⁷ y 430 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de mercurio y selenio respectivamente, en hígado del águila *Haliaeetus leucocephalus*¹¹⁸. A pesar de estos valores tan extremadamente altos, estos animales no mostraron ningún signo de intoxicación. Este hecho sugiere que la presencia de del selenio inhibe la toxicidad potencial que causa el mercurio.

4.1 MECANISMOS DE INTERACCIÓN ENTRE SELENIO Y MERCURIO

Los mecanismos concretos de interacción entre el mercurio y el selenio no se han conseguido dilucidar y se han postulado diversas hipótesis para explicar dicha interacción como se comenta continuación.

Redistribución del mercurio

Varios estudios demuestran que el selenio promueve la redistribución del mercurio de un órgano o fracción subcelular altamente sensible a otros menos sensibles.

El mercurio se puede encontrar unido principalmente a metalotioneínas ¹¹⁹. La presencia de selenio puede bloquear la unión del mercurio y la metalotioneína. Por

otro lado, también se ha demostrado que el selenio permite la liberación del mercurio enlazado a cisteína y su redirección a proteínas de elevado peso molecular¹²⁰.

Desgraciadamente, la redistribución del mercurio de órganos más sensibles a órganos menos sensibles no puede explicar los resultados de un gran número de estudios. Por ejemplo, el cerebro es un órgano altamente sensible al mercurio y se ha observado que la presencia de selenio provoca un aumento en la acumulación del mercurio.

Competencia por los mismos puntos de unión

Las relaciones mercurio-selenio encontradas en pescados comparadas con la concentración de ambos elementos en el medioambiente condujo a la conclusión de que el mercurio y selenio compiten por los mismos receptores localizados en los tejidos animales. Se cree que los puntos de unión son receptores de selenio y es posible que estos puedan ser ocupados por mercurio en función de su biodisponibilidad en el medioambiente¹²¹.

Formación de complejos mercurio-selenio

La administración simultánea de cloruro mercúrico y selenito sódico a ratas provoca una alteración de las proteínas plasmáticas que se enlazan al mercurio y al selenio si se compara con las observadas cuando cada elemento es administrado individualmente. Ambos elementos se unen a una única proteína del plasma, identificada como la selenoproteína P¹²².

Algunos estudios realizados con sangre de conejo han demostrado la reducción de selenito en los glóbulos rojos y su transporte al plasma en forma de seleniuro, donde reacciona con el cloruromercúrico para formar el complejo Hg-Se-plasma¹²³. Este complejo podría desempeñar un papel importante en la prevención de la toxicidad aguda ocasionada por el mercurio inorgánico, ya que al unirse el Hg, previene que alcance ciertos tejidos diana.

Aparte del complejo Hg-Se-plasma, el mercurio inorgánico se une a metabolitos o forma un complejo equimolecular Hg-Se que se une a especies de elevado peso molecular en el hígado.

Es importante mencionar que la presencia de mercurio hace que el seleniuro liberado durante la degradación de las selenoproteínas se pueda unir al mercurio, reduciendo la biodisponibilidad del selenio para la síntesis de proteínas.

En cuanto al metilmercurio, éste sufre un proceso de demetilación y puede experimentar los mismos mecanismos mencionados anteriormente para el caso del mercurio inorgánico¹²⁴.

Conversión de las formas tóxicas de mercurio en otras formas menos tóxicas

La transformación del metilmercurio a formas menos tóxicas puede ser uno de los posibles mecanismos de desintoxicación.

Numerosos grupos de investigación^{125, 126, 127, 128} han sugerido que la conversión del metilmercurio a mercurio inorgánico se ve favorecida por la presencia de selenio. Esta hipótesis fue reforzada por los niveles tóxicos de mercurio y selenio encontrados en animales que no mostraban ningún síntoma de toxicidad.

Mamíferos y aves marinas biotransforman lentamente el metilmercurio ingerido a mercurio inorgánico en el hígado, sin mostrar síntomas de contaminación.

Sin embargo, se encontró una elevada concentración de Hg inorgánico en el cerebro de monos alimentados crónicamente con metilmercurio y selenio.

El metilmercurio puede actuar como donante del grupo metilo para metilar al seleniuro (exhalación de compuestos metilados de selenio)¹²⁹.

Prevención del daño oxidativo

El selenio es un componente intrínseco de la glutatión peroxidasa cuya actividad se ve inhibida por el mercurio¹³⁰.

La glutatión peroxidasa es incapaz de proteger el hígado y el tejido nervioso de los cambios oxidativos inducidos por el mercurio. Ganther propuso una posible implicación de los radicales libres formados por la ruptura homolítica del metilmercurio en la inducción de los efectos neurotóxicos. Sin el tratamiento de selenio, el metilmercurio inhibiría la actividad de la glutatión peroxidasa, haciendo imposible la descomposición de los peróxidos que iniciarían la ruptura del metilmercurio en los radicales libres metil y mercurio, y consecuentemente dañaría los tejidos.

5. APOPTOSIS Y RUTAS DE PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA

5.1 APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada, que fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr y colaboradores¹³¹, es un mecanismo de “suicidio celular” genéticamente definido. Fisiológicamente, la apoptosis interviene en la eliminación de los tejidos dañados, el desarrollo embrionario, la renovación tisular y la regulación del sistema inmune^{132,133,134}. No obstante, en ciertas ocasiones se produce un defecto en su regulación que puede conducir a diversas enfermedades. Así, el incremento de la tasa de apoptosis contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas como el Parkinson o enfermedades autoinmunes¹³³, mientras que la falta de respuesta a las señales apoptóticas puede conducir al desarrollo del cáncer¹³³.

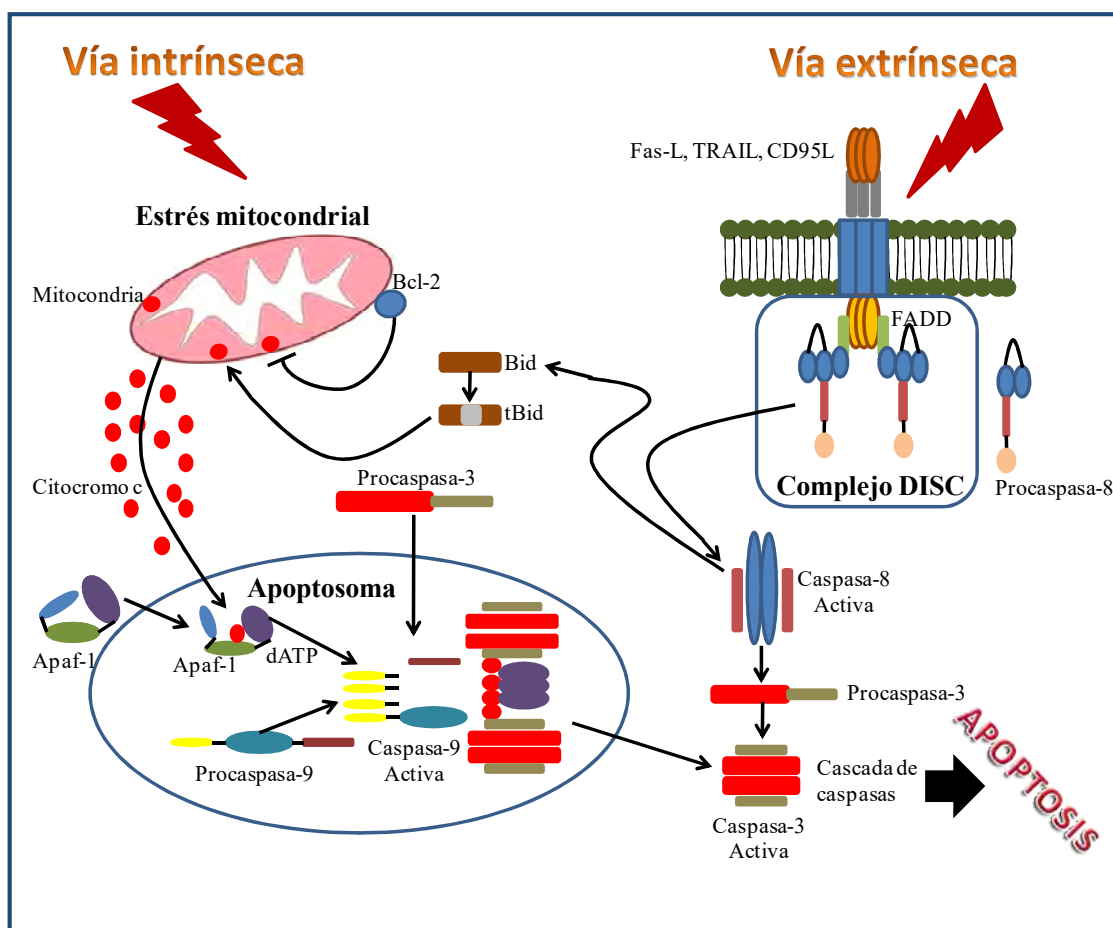


Figura 5. Esquema del proceso apoptótico por vía intrínseca e extrínseca (Adaptado de MacFarlane et al.¹³⁴)

Durante el proceso de apoptosis la membrana plasmática de la célula adquiere aspecto de burbuja (“blebbing”), se producen alteraciones en el citoesqueleto, la cromatina se condensa, disminuye el tamaño nuclear y se destruye el nucleolo¹³⁴. Finalmente, se produce la fragmentación del DNA debido a la activación de las endonucleasas y se forman los denominados cuerpos apoptóticos que pueden ser degradados por células vecinas o por fagocitos¹³⁵. En este caso no se produce respuesta inflamatoria al no romperse la membrana plasmática y liberarse los componentes celulares, al contrario de lo que pasa en las células que mueren por necrosis, donde hay ruptura de la membrana celular produciéndose así una respuesta inflamatoria¹³⁵.

El proceso de apoptosis puede transcurrir a través de dos vías: intrínseca (o mitocondrial) y extrínseca (Ver Figura 5).

En la vía intrínseca se produce la perturbación de la mitocondria causada por un estímulo apoptótico produciéndose así la liberación de proteínas, como el *citocromo c*, desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el *citocromo c* se une a *factor activador de proteasas apoptóticas-1* (Apaf-1) y posteriormente, y en presencia de dATP, se une a la *procaspasa-9* formándose así un complejo denominado apoptosoma y convirtiéndose *la procaspasa-9* en *caspasa-9* activa. El apoptosoma es capaz de activar a la *caspasa-3* que es la responsable de iniciar el desensamblaje celular y provocar la muerte celular programada¹³⁴.

La activación de la vía extrínseca comienza en la superficie celular tras la unión de un ligando específico, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, Fas-L, TRAIL, etc), al dominio extracelular de su respectivo receptor de muerte, perteneciente a la superfamilia del receptor del TNF (TNFR). Una vez que el ligando se une a su receptor, estos son capaces de unirse a FADD (factor associated death domain) y este a su vez se une a la *caspasa-8* ó *-10* formando así el complejo de señalización inducido por muerte (DISC) que conduce a la autoactivación y liberación de las *caspasas-8* ó *-10* activas y estas a su vez activarán las *capasas-3* y *-7*¹³⁴.

Tanto en la vía extrínseca como en la intrínseca las caspasas juegan un papel fundamental en el proceso de apoptosis pero, además de las caspasas, los miembros de la familia Bcl-2 también participan en el proceso apoptótico y se explican a continuación.

Caspasas

Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas)¹³⁶.

Todas las caspasas se sintetizan en su forma inactiva (procaspasa). Cada procaspasa consiste en un predominio N-terminal, una subunidad grande (de entorno a unos 20 kDa) y una subunidad pequeña (de entorno a unos 10 kDa). La ruptura y heterodimerización de la subunidad grande y pequeña resulta en la activación de las caspasas¹³⁵.

Se han identificado 14 miembros de la familia de las caspasas en mamíferos pero no todos los miembros de esta familia participan en el proceso de la apoptosis. Las caspasas se pueden dividir en tres subgrupos¹³⁵:

- Caspasas iniciadoras: Son las caspasas-2, -8, -9 y -10. Son las responsables de la ruptura y activación de las caspasas efectoras.
- Caspasas efectoras: Son las caspasas-3, -6, y -7. Las caspasas efectoras una vez activadas procesan a su vez otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas vías de apoptosis.
- Caspasas que participan en la activación de citoquinas: Son las caspasas-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14

Miembros de la familia Bcl-2

Bcl-2 es una familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en apoptosis celular ya que algunos de los miembros son pro-apoptóticos y otros de los miembros son anti-apoptóticos (Ver Figura 6). El balance de expresión de los miembros de la familia Bcl-2 es uno de los principales mecanismos que determina el destino de la célula (supervivencia o apoptosis)¹³⁴.

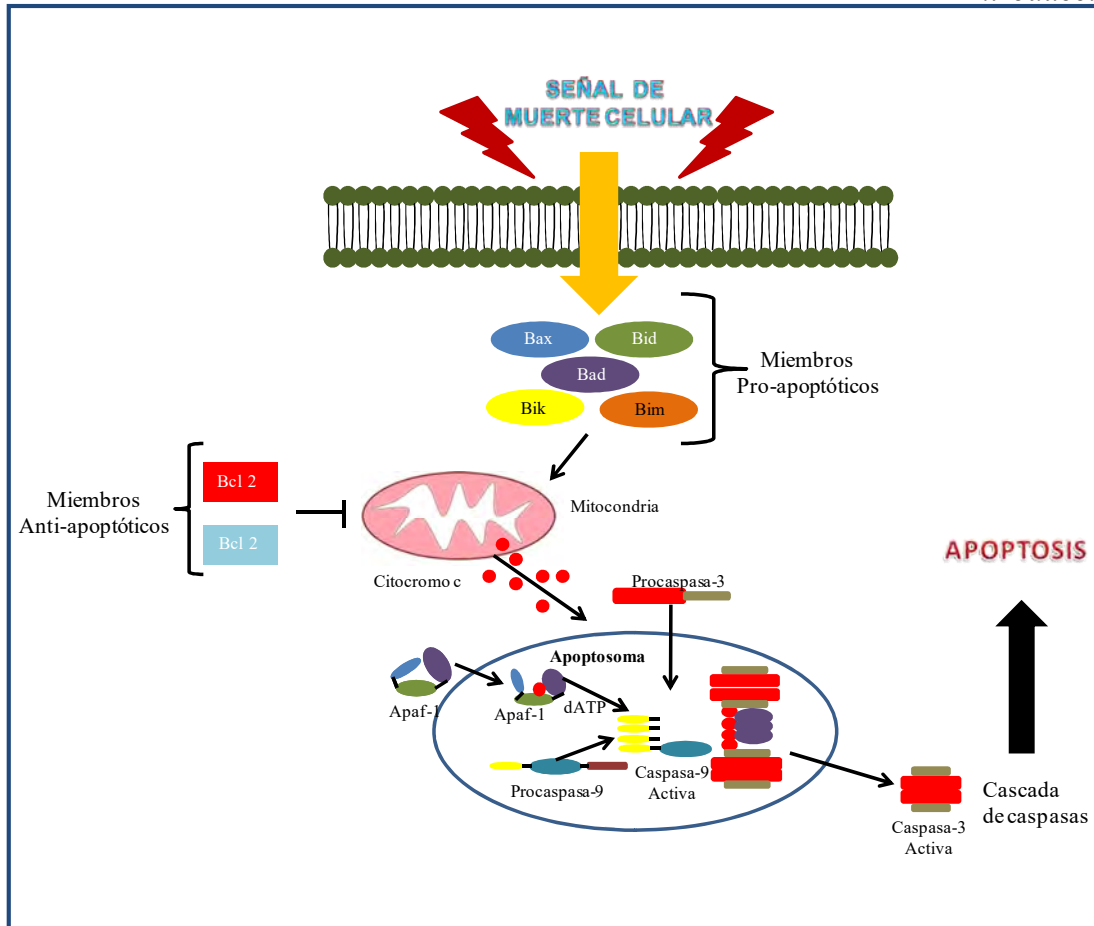


Figura 6. Esquema de los miembros de la familia Bcl-2 y su implicación en la apoptosis

Los miembros de la familia Bcl-2 se pueden dividir en subfamilias vienen definidas en parte por la homología con cuatro regiones denominadas dominios de homología Bcl-2 (BH)¹³⁷.

- La subfamilia Bcl-2 representa un grupo de proteínas apoptóticas y con cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH1-BH4). A este grupo pertenecen: Bcl-x_L, Bcl-w, Boo, Mcl-1, A1.
- La subfamilia Bax que incluye a Bax, Bak y Bok los cuales son miembros pro-apoptóticos y tiene tres dominios BH (BH1-BH3).
- La subfamilia BH3 que está formada por proteínas pro-apoptóticas como Bik, Bad, Bid, Blk, Hrk, BimL y BNIP3 y solo contienen un dominio de homología BH (BH3).

5.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y SUPERVIVENCIA

La activación de las rutas de señalización relacionadas con la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se ha relacionado con el crecimiento y la supervivencia celular tras la exposición a algún tipo de estrés^{138,139}. En la presente Tesis se va a relacionar estas vías de supervivencia con la interacción selenio-mercurio para averiguar más acerca de este antagonismo entre ambos elementos.

Vía de PI3K/AKT

La familia PI3K incluye a un grupo de quinasas caracterizadas por fosforilar el grupo 3'-OH del anillo inositol de los fosfatidilinositoles (PI), siendo el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP₃) el más común¹⁴⁰. Estas quinasas son heterodímeros formados por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora.

La PI3K controla varias funciones clave como son la proliferación, supervivencia celular, migración y angiogénesis^{138,140}.

PI3K es capaz de fosforilar a fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato (PIP₂) generando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), que es capaz de activar dianas *downstream*¹⁴¹. La serina/treonina quinasa AKT es una de las principales diana de PIP₃, y en humanos se han descrito 3 isoformas diferentes (AKT1, AKT2 Y AKT3).

La unión de AKT a PIP₃ provoca un cambio conformacional en AKT que hace que sea fosforilada y, por tanto, activada por las quinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDKs)¹³⁹. Entre las dianas de AKT se incluyen múltiples factores de transcripción y proteínas de señalización, de manera que la activación de AKT deriva en la disminución de los niveles de expresión o actividad de diversas proteínas proapoptóticas, como FasL y Bim^{138,139,142}, y en el incremento de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x_L, XIAPs^{138,139,143} y de las proteínas de supervivencia como la propia AKT^{138,139}. LA AKT también modula la glicolisis en la célula y, por tanto, el desarrollo celular¹³⁸. Una gran parte de los efectos mediados por AKT tienen como objetivo favorecer la supervivencia celular, siendo de gran importancia en determinados caso, como en la supervivencia neuronal en el desarrollo del sistema nervioso¹⁴⁴.

Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las cascadas de MAPKs participan en una gran cantidad de programas celulares, como diferenciación, movilidad, ciclo celular y muerte celular, y están conservadas evolutivamente en todos los eucariotas¹⁴⁵.

Normalmente se encuentran organizadas en módulos que comprenden tres quinasas, la última de las cuales tiene como dianas factores de transcripción. En mamíferos se suelen diferenciar tres tipos de MAPKs: ERK, que generalmente regula el crecimiento celular y diferenciación, p38-MAPK y JNK, éstas últimas más implicadas en respuestas de estrés como inflamación y apoptosis¹⁴⁵.

Las ERKs poseen dos isoformas de 44 y 42 kDa denominadas ERK1 y ERK2 respectivamente^{146,147,148}. La estimulación de ERK1/2 se relaciona principalmente con los procesos de supervivencia y proliferación celular^{146,147,148}. Así mismo, la activación de las ERKs también se asocia con la fosforilación e inactivación de miembros proapoptóticos de la familia de genes *bcl-2* como Bad^{146,147}.

La activación de las JNKs, motivada por diferentes estímulos de estrés, se relaciona de manera general con la inducción de apoptosis^{149,150} y también con la estimulación de la supervivencia/proliferación celular^{149,151}. Se ha descrito que las JNKs desarrollan una función pro- o anti-apoptótica dependiendo del tipo celular, naturaleza del estímulo, duración de su activación y la regulación de otras vías de señalización^{150,151}.

Las p-38 MAPKs, por lo general, son activadas simultáneamente con las JNKs por estímulos de estrés¹⁴⁸. Su activación, de manera similar a las JNKs, se relaciona con la inducción de muerte celular¹⁵², la promoción de la supervivencia¹⁵³, la proliferación¹⁵³, y la diferenciación celular¹⁵³.

6. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN Y ESPECIACIÓN DE SELENIO Y MERCURIO

6.1 TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestra es, frecuentemente, la etapa más larga, laboriosa y crítica para la detección y cuantificación de elementos metálicos a nivel de trazas¹⁵⁴. El

proceso debe ser, además, reproducible y eficaz, evitando pérdida de analito y/o contaminación por parte de los reactivos y materiales empleados^{155,156,157}. En todo momento debe asegurarse la integridad tanto de la forma química como de la concentración de la especie buscada.

Las matrices en las que se han de determinar los compuestos de interés pueden tener características muy diferentes, siendo necesario en primer lugar establecer metodologías de muestreo y conservación de muestras para después aplicar métodos de extracción de las especies presentes.

Existen distintos factores que pueden ocasionar pérdidas, contaminación o transformación de especies durante los procesos de toma y almacenamiento de la muestra. Las fuentes de error en la etapa de muestreo para la posterior determinación de selenio y mercurio pueden ser importantes como consecuencia de las bajas concentraciones en que ambos analitos se encuentran en el medio ambiente. Por otro lado, durante el almacenamiento de la muestra se puede alterar la concentración y la forma original del analito como consecuencia de interacciones químicas entre especies o con el material del recipiente, por la acción microbiana, la temperatura, el pH, la luz, etc^{158,159,160}, por lo que en muchos casos puede requerirse la adición de agentes conservantes para prevenir la degradación de las especies antes del análisis.

La mayoría de las técnicas analíticas instrumentales empleadas para la determinación de contenidos totales requieren la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra. Generalmente, el análisis de muestras biológicas y medioambientales requiere una mineralización por vía húmeda de las muestras.

En la digestión por vía húmeda es frecuente la adición de uno o más reactivos, generalmente ácidos, con propiedades complementarias (ácido-base, redox y/o complejantes) que mejoran el proceso de mineralización. La digestión se acompaña con un calentamiento en placa calefactora o en horno (200-300°C), bien en recipientes cerrados o abiertos. En los recipientes cerrados se alcanzan no sólo altas temperaturas sino también elevadas presiones que contribuyen a la destrucción de la materia orgánica de una forma más eficaz.

La digestión en sistemas abiertos sólo es adecuada cuando el analito a determinar no forma especies volátiles, por lo tanto para la determinación de

mercurio y de compuestos volátiles de selenio se recomienda realizar la mineralización por vía húmeda en recipientes cerrados.

El empleo de hornos microondas se ha extendido en los últimos años por la reducción del tiempo de mineralización, de la cantidad de reactivos, así como por la eficiencia y reproducibilidad del proceso. La digestión puede llevarse a cabo con HNO_3 ¹⁶¹, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ ^{162, 163, 164}, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ ^{165,166} o con mezclas del HNO_3 con otros ácidos¹⁶⁷. El horno de microondas es por tanto, un dispositivo muy adecuado para la determinación de compuestos volátiles en diversas muestras.



Figura 6. Horno microondas

La radiación de ultrasonidos se ha empleado frecuentemente en el tratamiento de muestras, siendo los métodos más empleados de dos tipos; baño y sonda. El baño de ultrasonidos consta de un recipiente de acero lleno de agua y en el que la distribución de la energía acústica es indirecta y de forma no homogénea.

En la sonda de ultrasonidos con potencias incluso 100 veces superiores al baño (Figura 6) la sonda se introduce directamente en la muestra. Con la sonda se alcanzan altas temperaturas, por lo que a veces se requiere la aplicación de pulsos para minimizar este incremento. Uno de los problemas que presenta es la emisión de armónicos audibles que resultan muy molestos.

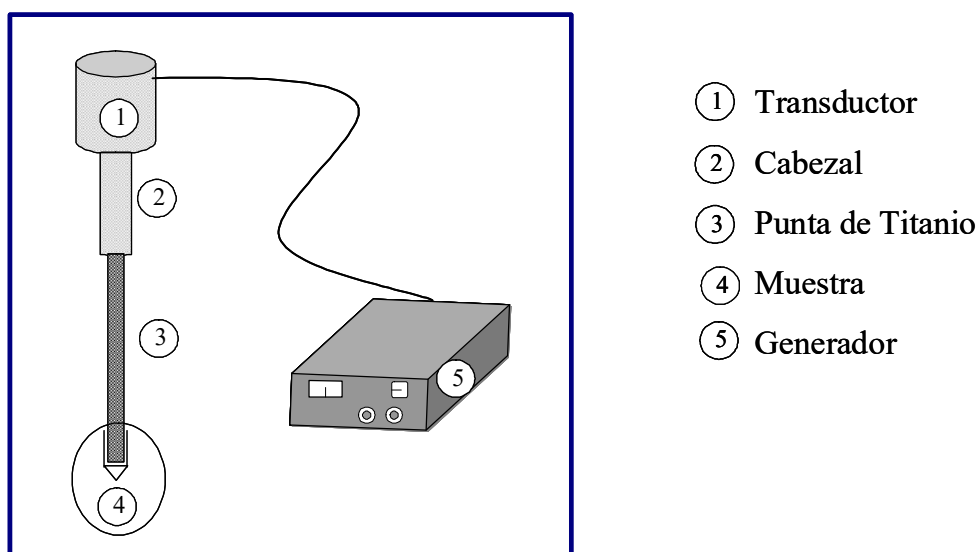


Figura 7. Representación esquemática de la sonda ultrasónicos.

Desgraciadamente, el contenido total de un determinado elemento en una muestra no proporciona la información necesaria para evaluar el papel biológico que desempeña, su toxicidad o su biodisponibilidad. De hecho, para explicar la actividad biológica (biodisponibilidad, funcionalidad, toxicidad, etc.) de los elementos en el medioambiente y/o seres vivos es imprescindible la identificación y cuantificación de las especies presentes, es decir, es necesario llevar a cabo estudios de especiación.

La tarea de identificar y determinar en una muestra las diferentes formas químicas en que se encuentra un determinado analito es extremadamente compleja, y en la actualidad constituye uno de los importantes campos de investigación.

Los principales problemas se originan por las siguientes causas:

- Durante el tratamiento de la muestra se tienen que preservar las especies.
- Se debe disponer de técnicas de elevada sensibilidad para poder cuantificar dichas especies.
- Falta de materiales de referencia certificados para la validación de resultados y de patrones comerciales de las diversas especies para la identificación de las mismas.
- Por último, la falta de conocimiento de la estabilidad de especies en disolución dificulta su identificación/cuantificación.

6.2 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO Y SUS ESPECIES

El metabolismo, transporte, biodisponibilidad y toxicidad depende de la forma química en la que se encuentre el selenio en la muestra. El selenio existe bajo diversas formas químicas: especies inorgánicas (selenito, selenato) o especies orgánicas (selenoaminoácidos, formas metiladas y selenoproteínas). En la Tabla 3 aparecen distintas especies de selenio de interés en estudios de especiación:

Tabla 3. Compuestos de interés en la especiación de selenio.

Nombre químico	Fórmula
Hidruro de selenio	H_2Se (volátil)
Selenito	SeO_3^{2-}
Seleniato	SeO_4^{2-}
Selenocianato	HSeCN
Catión trimetilselenio	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Dimetilselenio	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ (volátil)
Dimetildiselenio	$(\text{CH}_3)_2\text{Se-Se}(\text{CH}_3)_2$ (volátil)
Dimetilseleniosulfuro	$(\text{CH}_3)_2\text{Se-S}(\text{CH}_3)_2$ (volátil)
Dióxido de dimetilselenio	$(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$ (volátil)
Dimetilseleniopropionato	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
Metilselenol	CH_3SeH
Ácido metilselenínico	$\text{CH}_3\text{Se}(\text{O})\text{OH}$
Ácido metilselénico	CH_3SeOH
Selenocisteína	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-H}$
Seleno-metil-selenocisteína	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Selenocistina	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-Se-SeCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Selenometionina	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_3$
Selenoetionina	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{CH}_3$
γ -glutamyl-Se-metil-selenocisteína	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{-CO-NHCH}(\text{COOH})\text{CH-Se-CH}_3$
Selenocistationina	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$
Selenohomocisteína	$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Se-H}$
Selenoazúcares	Varias estructuras de azúcares
Selenoproteínas	Varias enzimas y proteínas

Por lo tanto es importante conocer no solo el contenido total de selenio en una muestra, sino también en qué forma química se encuentra presente.

La especiación de selenio (proceso analítico para la identificación y la cuantificación de las especies de selenio) consta de varias etapas: pretratamiento de la muestra (extracción, preconcentración, derivatización) separación de las especies e identificación. Cada una de estas etapas influye en la exactitud y la calidad del resultado final (identificación y cuantificación de especies). La especiación de selenio

no es una tarea sencilla puesto que el selenio se encuentra presente en las muestras en bajas concentraciones y distribuido en distintas especies. La especiación requiere que las especies de selenio se extraigan cuantitativamente de la matriz, se identifiquen de manera inequívoca y se cuantifiquen correctamente.

Tratamiento de la muestra

La elección del procedimiento del tratamiento de muestra depende de la matriz, de la forma química en la que se encuentre el selenio en la muestra y de la instrumentación elegida para la separación y la identificación de las especies. El tratamiento de la muestra es la primera etapa del proceso en la que se deben extraer cuantitativamente las especies de selenio evitando posibles interconversiones.

Contenido de selenio total

Varios investigadores han señalado que la digestión por vía húmeda proporciona una baja recuperación de selenio en muestras biológicas, además de requerir tiempos elevados de digestión con el consiguiente riesgo de contaminación e incluso pérdida de los compuestos volátiles de selenio. Todo ello puede originar resultados erróneos en su cuantificación¹⁶⁸.

Considerando estos inconvenientes, la digestión en microondas es un método eficiente y efectivo de mineralización y liberación del selenio en las matrices biológicas obteniendo una buena reproducibilidad y a su vez una reducción en los tiempos de digestión. La digestión se lleva a cabo en reactores cerrados de teflón mejorando la eficiencia de la digestión en comparación con los reactores abiertos y se evitan pérdidas por volatilización¹⁶⁹.

Extracción de especies de selenio

Los procedimientos de extracción cuantitativa de las especies de selenio no deben ser agresivos para evitar que se produzca la transformación de especies o pérdidas por volatilización, lo que llevaría a cometer errores en su cuantificación. Los procedimientos de extracción más utilizados están basados en hidrólisis enzimáticas empleando enzimas como por ejemplo la proteasa XIV o mezclas de enzimas como la pronasa E/lipasa. También se han utilizado enzimas no proteolíticas para la extracción de especies de selenio, como por ejemplo la driselasa, que es capaz de extraer a los compuestos de selenio unidos químicamente o físicamente a la pared celular. La

hidrólisis ácida con HCl o la hidrólisis básica empleando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) constituyen otras alternativas, pero en muchos casos asociadas a un riesgo de que se produzca transformación de especies¹⁷⁰.

La hidrólisis enzimática generalmente requiere tiempos de extracción elevados (24-48h) lo que aumenta los riesgos anteriormente citados. Una manera de reducir los tiempos de extracción y a su vez mejorar la eficiencia del proceso es acelerar la extracción enzimática mediante el empleo de microondas o la energía de ultrasonidos. En un estudio reciente se ha empleado la extracción enzimática asistida por microondas (MAEE) utilizando una mezcla de pronasa E y lipasa en muestras de arroz llegándose a conseguir una eficiencia de extracción del 100% en 4 minutos¹⁷¹. La misma técnica también se ha empleado para la extracción de las especies de selenio en pescado, pero en este tipo de matriz la recuperación de las especies no fue cuantitativa¹⁷². Todo ello pone de manifiesto que la eficiencia de extracción no solo depende del tratamiento de muestra empleado sino de la matriz.

La sonda de ultrasonidos constituye otra alternativa para acelerar la extracción enzimática. La sonda de ultrasonidos produce un fenómeno denominado cavitación en el cual se alcanzan elevadas temperaturas y presiones puntuales, favoreciendo así el proceso de extracción mediante un aumento de la solubilidad de los analitos en el medio extractante y un incremento de la difusividad de los analitos hacia el medio de extracción. Con la sonda de ultrasonidos se consiguen extracciones cuantitativas de selenio en un tiempo que oscila entre 30 s- 3 min^{173,174}.

La hidrólisis enzimática es necesaria en aquellos casos que queramos extraer selenoaminoácidos unidos a proteínas (selenocisteína o selenometionina). Tanto la selenometilselenocisteína como la especie γ -glutamilselenometilselenocisteína pertenecen al grupo de aminoácidos no proteicos y solubles en agua, por lo que la extracción únicamente con agua caliente ha proporcionado recuperaciones elevadas de ambos selenoaminoácidos¹⁷⁰.

La extracción acelerada con disolventes (ASE) también se ha empleado con éxito para la especiación. En este caso la muestra, sólida o semi-sólida, se pone en contacto con un extractante alcanzándose, durante la extracción, temperaturas de 50-200°C y presiones de 500-3000 psi durante cortos periodos de tiempo (5-10 min). ASE se ha

empleado para la extracción de selenio de levaduras enriquecidas en selenio y de plantas^{175,176,177}.

Gómez-Ariza et al. emplearon la extracción con líquidos presurizados (PLE) para la separación y detección de: selenocisteína, selenometionina, Se (IV), Se (VI) y selenoetionina presentes en una muestra de levadura¹⁷⁸.

El empleo de extracciones secuenciales constituye otra estrategia para mejorar los rendimientos de extracción. Mounicou et al. emplearon una extracción secuencial en muestras de ajo liofilizadas. Para ello, inicialmente se llevó a cabo la extracción de los compuestos de selenio solubles en agua, posteriormente para poder extraer los compuestos adheridos a la pared celular se usó una mezcla de celulasa, chitinasa y β -glucanasa. La tercera etapa consistió en una proteólisis con proteasa XIV para la extracción de las especies de selenio unidas a proteínas, seguida de una hidrólisis ácida para la liberación de los compuestos de selenio unidos a la materia orgánica. La recuperación del Se^{2-} y Se^0 requirió el empleo de sulfito sódico y CS_2 , respectivamente¹⁷⁹. Encinar et al.^{180,181,182} emplearon otra estrategia de extracción secuencial en una muestra de levadura, con el fin de diferenciar entre los compuestos de selenio solubles o insolubles en agua, los compuestos unidos a proteínas o a polisacáridos. Para ello primero se trató la muestra con agua caliente, seguida de la adición de driselasa en Tris-HCl, posteriormente se extrajeron los compuestos insolubles en agua y unidos a proteínas con Tris-HCl con SDS, el siguiente paso fue una hidrólisis enzimática con pronasa y lipasa y para finalizar se realizó una hidrólisis básica con TMAH.

La fracción de selenio bioaccesible puede establecerse utilizando un método *in vitro* de digestión gastrointestinal. En este caso, el método de Luten et al.¹⁸³ es el más utilizado. Este procedimiento consiste en dos etapas, en la primera etapa se lleva a cabo la digestión gástrica sometiendo la muestra durante 4h y a 37°C a la acción del jugo gástrico conteniendo un 6% de pepsina, en la segunda etapa se somete a la muestra a la digestión gastrointestinal donde el residuo de la etapa anterior se trata con 1.5% de pancreatina y 0.5% de amilasa, simulando así el jugo intestinal.

Hay que tener en cuenta que durante el proceso de extracción se puede producir la transformación de especies. Una de las más comunes es la oxidación de metionina y la oxidación de selenocisteína. Para evitar o minimizar estas oxidaciones se han

buscado distintas estrategias. Para el caso de la selenocisteína se puede emplear iodoacetamida para proteger al grupo sulfhidrilo convirtiéndola en selenocisteína carboximetilada. Otra alternativa para estabilizar tanto la selenocisteína como la selenometionina es el uso de agentes reductores como son el DTT y el β -mercaptoetanol¹⁷⁰.

Para las especies volátiles de selenio (Tabla 3) se ha empleado la extracción en fase sólida (SPE) o la microextracción en fase sólida (SPME), siendo la combinación del muestreo en espacio de cabeza conjuntamente con SPME la aproximación más utilizada. Aún así, otros métodos como son el atrapamiento criogénico u otras técnicas de atrapamiento también han sido empleadas para la extracción de especies volátiles de selenio⁵⁷.

En los casos en que se requiera obtener información de las especies de selenio, el tratamiento de la muestra debe asegurar que se mantiene la integridad de dichas especies. Los tratamientos más comunes suelen consistir en: extracción en agua^{123,149}, mezcla de metanol y ácido clorhídrico¹⁸⁴ o en una disolución reguladora, mediante incubación a temperatura controlada o empleando un homogenizador¹⁸⁵.

La proteólisis constituye uno de los principales problemas en la extracción de proteínas de la célula, por producirse la liberación de proteasas que normalmente están separadas en diferentes compartimentos, produciendo la acidificación del medio y la proteólisis. De esta manera, las proteínas se pueden desnaturalizar y exponer a ataques proteolíticos. Con el objetivo de prevenir que esto ocurra, se recomienda la extracción de proteínas a temperaturas bajas (4°C), en las que la actividad de las proteasas es menor, mantener el pH entre 6 y 8, y añadir un cóctel inhibidor de proteasas a la disolución reguladora^{185,186}.

Determinación de especies de selenio

Dado que existe un estrecho intervalo entre los niveles en los que el selenio se considera esencial y tóxico, es de gran importancia que las medidas de las formas químicas sean exactas. Este tipo de análisis entra dentro del campo de la especiación, específicamente dentro de la especiación de selenio. Habitualmente, la única forma de determinar las especies en tiempo real es mediante el acoplamiento de dos técnicas: una técnica para separar las especies químicas de interés y un método de detección

sensible que permita la determinación del analito a bajos niveles de concentración, que es lo que se conoce con el nombre de técnicas híbridas.

Técnicas híbridas

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas híbridas para abordar los problemas de la especiación. En los primeros estudios de especiación se puso de manifiesto que las mezclas complejas no podían ser analizadas sin el empleo de una técnica previa de separación. Sin embargo, los detectores convencionales que se emplean en los métodos de separación no proporcionaban información específica para el elemento, la cual no solo es útil sino necesaria en los estudios de especiación. La cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos se acoplaron por primera vez a detectores elementales a finales de los años 70 y principios de los 80 por Van Loon¹⁸⁷ y Suzuki¹⁸⁸. Las configuraciones iniciales emplearon la absorción atómica, la fluorescencia atómica, y los espectrómetros atómicos de emisión. Posteriormente, las continuas mejoras en la espectrometría de masas iónica elemental dieron origen a un aumento de su empleo en técnicas híbridas. En particular, el acoplamiento HPLC-ICP-MS ha sido ampliamente aplicado en los estudios de especiación llegando, incluso, a convertirse en técnica de rutina¹⁸⁹. Otras técnicas de separación empleadas han sido la cromatografía de gases¹⁹⁰, aunque esta técnica está restringida a compuestos volátiles, a menos que se empleen técnicas de derivatización previa y la electroforesis capilar (CE)¹⁹¹⁻¹⁹³, debido a su alta eficacia de separación y a los pequeños volúmenes de muestra que requiere.

Para la determinación de las especies de selenio la técnica más común para la detección es el ICP-MS, puesto que proporciona bajos límites de detección y la posibilidad de realizar medidas de relaciones isotópicas, ambas características muy útiles a la hora de detectar y cuantificar los bajos niveles de selenio en las muestras.

ICP-MS y Selenio

La técnica de ICP-MS fue desarrollada, hace dos décadas, por los grupos de investigación de Houk y Gray. El ICP-MS ofrece varias ventajas para la especiación frente a otro tipo de detectores. Estas ventajas incluyen análisis multielemental, determinación de relaciones isotópicas y una elevada sensibilidad con un amplio

intervalo dinámico lineal¹⁹⁴. El ICP-MS ofrece un intervalo dinámico lineal de 4 a 11 órdenes de magnitud para la mayoría de elementos químicos¹⁹⁵.

El selenio posee interferencias espectrales lo que conlleva dificultades a la hora de su detección mediante el ICP-MS. La formación de iones poliatómicos en el plasma provoca interferencias con algunos de los isótopos de selenio^{196,197} (ver Tabla 4). La mayor interferencia es la formación del dímero $^{40}\text{Ar}_2^+$ que solapa con el isótopo más abundante: ^{80}Se . Por este motivo se suelen monitorizar isótopos menos abundantes: ^{82}Se , ^{78}Se , ^{77}Se . Para la especiación de selenio se suele emplear HPLC-ICP-MS cuyas fases móviles pueden generar iones poliatómicos que interfieren con la medida de los isótopos de selenio. En muchas ocasiones algunas interferencias pueden ser eliminadas cromatográficamente. Chassaigne et al.¹⁹⁸ monitorizaron la relación entre los isótopos ^{78}Se y ^{82}Se para verificar la existencia de interferencias debido a la formación de $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, a causa del Tris-HCl empleado como fase móvil. Se observó que la relación entre los isótopos de selenio coincidía con su abundancia natural relativa, lo que puso en evidencia que no existen interferencias con el empleo de esta fase móvil. En la Tabla 4 se detallan los distintos isótopos de Se, sus abundancias en % así como las posibles interferencias isobáricas y poliatómicas más importantes.

Tabla 4: Abundancia natural de los isótopos estables de selenio y sus interferencias isobáricas y poliatómicas

Isotopo de selenio	Abundancia (%)	Interferencias
74	0.89	$^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{74}\text{Ge}^+$
76	9.37	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{31}\text{P}_2^{14}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}_2^+$, $^{76}\text{Ge}^+$
77	7.63	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{38}\text{Ar}_2\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$
78	23.77	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{78}\text{Kr}^+$, $^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$
80	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$
82	8.67	$^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2^+$, $^{82}\text{Kr}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$, $^{81}\text{BrH}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{81}\text{BrH}^+$

El empleo de celdas de colisión o reacción constituye una alternativa importante para la eliminación de las interferencias poliatómicas. La celda de colisión o reacción se

sitúa antes del cuadrupolo. La celda consiste en un multipolo (cuadrupolo, hexapolo u octopolo) y opera en modo de radio frecuencia para hacer colisionar o reaccionar a los iones en la celda con un gas de colisión o reacción. En la celda de colisión los iones poliatómicos colisionan con un gas inerte reduciendo su energía evitando así que interfieran con los analitos de interés. En la celda de reacción, los interferentes o los iones de los analitos reaccionan químicamente con un gas. El dímero de argón ($^{40}\text{Ar}_2^+$), el cual interfiere con $^{80}\text{Se}^+$, se puede minimizar con el empleo de celdas de colisión o reacción. El helio es un gas inerte y se usa a menudo en las celdas de colisión para todos los elementos y ocasionalmente para el selenio^{199,200}. Los gases empleados para eliminar las interferencias del selenio en las celdas de colisión o reacción son: hidrógeno, óxido de nitrógeno¹⁹⁹, metano²⁰¹ y combinaciones de nitrógeno y amoníaco²⁰². El hidrógeno es el gas mas empleado para el análisis de selenio, se ha demostrado que el hidrógeno es capaz de reducir hasta 6 órdenes de magnitud la interferencia provocada por el dímero de argón^{203,204}. Los límites de detección alcanzados con el empleo de hidrógeno son mejores que los que se alcanzan con helio u óxido de nitrógeno¹⁹⁹. Aún así hay que tener ciertas precauciones a la hora de emplear las celdas de colisión o reacción para la determinación del selenio, puesto que si se emplea hidrógeno como gas de reacción pueden aparecer nuevas interferencias. Si hay bromo en las muestras se pueden producir interferencias poliatómicas debidas a la formación de $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ y $^{81}\text{Br}^1\text{H}^+$. Los fluidos extracelulares, como la orina y el plasma, contienen altos niveles de bromo que puede ocasionar una sobreestimación de los niveles de ^{80}Se y ^{82}Se .

El elevado potencial de ionización de selenio (9.75eV) limita el grado de ionización en el plasma. Varios autores han propuesto el empleo de modificadores orgánicos^{205,206}, que aumentan el contenido de C^+ y por tanto favorecen la ionización de compuestos con menores energías de ionización que el carbono (11.25 eV) transfiriendo así, electrones al carbono. Warburton et al.²⁰⁷ adicionaron metano al ICP y observaron que los límites de detección mejoraban, en un factor de 9, en comparación con el plasma de Ar convencional.

Otra estrategia para mejorar la sensibilidad es el empleo de nebulizadores ultrasónicos. Se ha comprobado que con el uso de nebulizadores ultrasónicos los

límites de detección alcanzados son 6 veces menores que los obtenidos con nebulización neumática.

La dilución isotópica se ha usado frecuentemente con objeto de cuantificar las especies de selenio. La dilución isotópica consiste en la adición de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido de selenio a la muestra. Los efectos de deriva de la señal y otros efectos relacionados con la matriz se minimizan con el uso de la dilución isotópica como patrón interno.

HPLC-ICP-MS

Para la interfase entre el HPLC y el ICP-MS los nebulizadores más utilizados son los neumáticos, tanto los concéntricos como los de flujo cruzado. Los flujos que habitualmente se emplean en HPLC oscilan entre $0.2-1.5 \text{ ml min}^{-1}$ los cuales son compatibles con los sistemas de nebulización convencional utilizando los nebulizadores de flujo cruzado o bien los concéntricos. Para minimizar el ensanchamiento de los picos, la línea de transferencia desde la salida de la columna hacia el nebulizador tiene que ser lo más corta posible.

La eficiencia de transporte de la muestra es generalmente más pequeña cuanto mayor es el flujo del sistema de HPLC. Con los nebulizadores concéntricos esta eficiencia es tan de solo un 2% pero puede mejorar hasta un 20% usando flujos de 0.1 ml min^{-1} . No obstante, este tipo de flujos requiere el uso de micro-nebulizadores.

Uno de los inconvenientes del acoplamiento HPLC-ICP-MS es que a veces es necesario el empleo de modificadores orgánicos. El ICP-MS es capaz de tolerar hasta un 5% de modificadores orgánicos, concentraciones superiores originan problemas de inestabilidad del plasma y depósitos de carbono en los conos²⁰⁸. Estos problemas se pueden minimizar con la adición de oxígeno al flujo de nebulización, o incrementando la frecuencia de radio frecuencia del plasma, empleando conos de platino reduciendo, el flujo de nebulización o incluso usando sistemas de nebulización directa (DIN) o un nebulizador con una membrana de desolvatación. La refrigeración de las cámaras de nebulización también ha resultado ser muy eficaz. Si el elemento a determinar estuviese presente en concentraciones muy elevadas, una alternativa podría ser la dilución post-columna. Otra alternativa es el empleo de micro- o nano-nebulizadores

con flujos que van desde 200 nL min^{-1} hasta $4 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ lo que permite aumentar la cantidad relativa de modificadores orgánicos en la fase móvil²⁰⁹.

La cromatografía de gradiente puede provocar problemas en el ICP-MS ya que el cambio en la composición de la fase móvil altera la temperatura del plasma y con ello la densidad electrónica, lo que provoca una variación en las eficiencias de ionización y en la energía de los iones formados. Empleando una cámara de nebulización, si se produce un cambio en la concentración de los disolventes, se puede producir lo que se conoce como efecto memoria debido a la adhesión de los disolventes a las paredes de la cámara de nebulización y debido a la re-volatilización²¹⁰.

HPLC es la técnica de separación más empleada para la separación de las especies de selenio, puesto que la mayoría son especies no volátiles (ver Tabla 3). Presenta una mayor versatilidad que la cromatografía de gases, ya que para análisis de compuestos no volátiles requiere una etapa previa de derivatización.

Los límites de detección para el selenio usando HPLC-ICP-MS son generalmente bastante bajos y se pueden mejorar con el empleo de las celdas de colisión o reacción.

El fácil acoplamiento entre el HPLC y el ICP-MS y los bajos límites de detección que se consiguen, hacen del acoplamiento HPL-ICP-MS la técnica más empleada para los estudios de especiación de selenio. Los mecanismos de separación más empleados son el de intercambio iónico, fase inversa, pares iónicos, exclusión molecular, cromatografía quiral entre otras.

Cromatografía de fase inversa y pares iónicos:

En la cromatografía de fase inversa (de amplio uso para la especiación de selenio) la fase móvil es acuosa y puede contener cierta proporción de modificador orgánico y la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Cuando se basa en la formación de pares iónicos se le añade un contraion a la fase móvil que juega un papel en el control de la selectividad y retención de los analitos. La cromatografía de pares iónicos facilita la separación de especies iónicas y también de especies neutras, siendo esta una de las ventajas de este modo de separación. La separación de los analitos por pares iónicos depende de algunas variables como son la concentración de disolución reguladora, el pH, la fuerza iónica de la fase móvil, la hidrofobicidad del contraion y también de las propiedades de la fase estacionaria. La elección de la fase estacionaria depende de los analitos a separar. Para los selenoaminoácidos se emplean fases

estacionarias con cadenas hidrocarbonadas largas (C18 o C8) mientras que para selenoproteínas o péptidos se usan fases estacionarias con cadenas hidrocarbonadas más cortas (C8 o C4).

Vonderheide et al.²¹¹ consiguieron separar selenito, selenocisteína, selenometionina y selenoetionina utilizando la cromatografía de fase inversa con pares iónicos empleando para ello una columna C8. La fase móvil fue 90/10 (v/v) agua/metanol con 5 mM de citrato y 5 mM de ácido hexanosulfónico como par iónico.

Generalmente las concentraciones de TFA (ácido trifluoroacético) son bajas (0.1% o menos), pero se ha demostrado que concentraciones más elevadas de TFA (1%) mejora la resolución de los compuestos orgánicos de selenio y algunos selenoaminoácidos^{212,213}. El empleo de HFBA (ácido heptafluorobutanoico) como formador de par iónico mejora la resolución de muchos de los compuestos orgánicos de selenio. Kotrabi et al.²¹⁴ separaron 20 compuestos de selenio con una buena resolución empleando una columna RP-8 en modo isocrático cuya fase móvil era 99/1 (v/v) de agua/metanol con 0.1% HFBA. Las fases móviles que contiene un 0.1% de HFBA presentan mejor resolución para los compuestos de selenio que aquellas que contienen 0.1 % PFPA (ácido pentafluoropropinoico) o 0.1% TFA²¹⁴. Las fases móviles que contienen HFBA se usan en estudios con sistemas de detección alternativos al ICP (ESI-MS) que nos permite obtener información estructural de los compuestos de selenio. Montes-Bayon et al.²¹⁵ utilizaron una fase móvil 0.1% HFBA con 90/10 (v/v) agua/metanol con una columna C8 para estudiar los extractos obtenidos de *Brassica Juncea* usando ESI-MS en paralelo con análisis con el ICP-MS.

Intercambio iónico:

Con la cromatografía de intercambio iónico se pueden separar iones o analitos fácilmente ionizables. La cromatografía de intercambio iónico utiliza un mecanismo de intercambio entre iones de la fase estacionaria e iones de carga opuesta presentes en la fase móvil. Hay dos tipos de cromatografía de intercambio iónico: aniónico y catiónico, y ambos tipos se han utilizado para la especiación de selenio. La fuerza iónica de los analitos, el pH de la fase móvil, la temperatura y la fuerza iónica de la fase móvil pueden influir en la separación y en la retención de los analitos.

Huerta et al.²¹⁶ separaron selenometionina, selenito y selenato de un extracto de levadura usando una columna de intercambio aniónico con una fase móvil de citrato

amónico en un 2% de metanol en modo isocrático. Utilizaron un gradiente de pH para separar compuestos procedentes de extractos de harina. Larsen et al.²¹⁷ emplearon una columna de intercambio catiónico usando un gradiente de 0.75 mM hasta 8 mM de formiato de piridina y 97/3 (v/v) de agua/metanol, consiguiendo separar 10 compuestos orgánicos de selenio. Reyes et al.²¹⁸ analizaron los extractos de levadura usando una fase móvil de fosfato e intercambio aniónico.

Las fases móviles más comunes en la cromatografía de intercambio iónico contienen fosfato^{198,218}, citrato¹⁸⁴ y formiato^{201,217}. Aún así, se intenta evitar las fases móviles que contienen fosfato de sodio o de potasio ya que producen residuos en los conos del ICP-MS. Como alternativa se intentan utilizar disoluciones reguladoras volátiles cuando se usa la cromatografía de intercambio iónico.

Exclusión molecular:

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) se suele utilizar en estudios de especiación de selenio para caracterizar selenoproteínas.

La cromatografía de exclusión molecular separa los compuestos según su volumen hidrodinámico.

SEC no ofrece una gran resolución a la hora de identificar las especies mediante ICP-MS, por eso se suele emplear en combinación con otros métodos cromatográficos. Mounicou et al.²¹⁹ usaron una cromatografía bidimensional para separar las proteínas de selenio encontradas en *B. juncea*. Una columna Superdex 75 se empleó para colectar las fracciones de *B. juncea*; estas fracciones se analizaron posteriormente por una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 GL. Moreno et al.²²⁰ emplearon dos columnas diferentes de exclusión molecular: Biosep-SEC-200 y Superdex Peptide HR 10/30 en combinación con una columna de intercambio catiónico: Hamilton PRP-X200 para el estudio de compuestos de selenio en distintas muestras: pescados, mariscos, trébol, trigo, harina y levadura.

La cromatografía SEC también se ha utilizado en combinación con otras técnicas de separación como por ejemplo con la electroforesis capilar para la especiación de selenio en extractos de levadura²²¹.

Cromatografía quiral:

La presencia de átomos de carbono asimétricos en los α -aminoácidos y en varios compuestos de selenio produce enantiómeros quirales con diferentes actividades biológicas y fisiológicas. Hay dos maneras de separar los compuestos quirales:

a) Mediante el empleo de una fase estacionaria quiral

b) Mediante una derivatización pre-columna con un agente quiral y posterior separación de los diastereoisómeros en una columna de HPLC quiral.

Se han utilizado fases estacionarias quirales para la separación de enantiómeros de selenometionina en extractos de levadura²²². Sutton et al.²²³ propusieron un método para separar los enantiómeros D,L-selenometionina, D,L-selenoetionina y D,L-selenocistina y Ponce de Leon et al.²²⁴ lo aplicaron a la separación de enantiómeros de un extracto de cebolla enriquecida en selenio.

La derivatización pre-columna con un agente quiral también se ha empleado en la especiación de selenio. Montes-Bayón et al.²²⁵ emplearon la derivatización con el reactivo Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida) para analizar varios suplementos alimenticios y una disolución parenteral de selenometionina. En dicho estudio se demostró que la disolución parenteral de selenometionina contenía D- y L-selenometionina.

Otros tipos de HPLC:

Mazan et al.¹⁹⁹ separaron selenito y selenato usando una fase estacionaria de carbón poroso grafitizado.

La cromatografía de afinidad también se ha utilizado para separar compuestos de selenio; Reyes et al.²²⁶ usaron columnas de afinidad de sefarosa para la caracterización de selenoproteínas.

Como se ha comentado previamente, la cromatografía de fase inversa con pares iónicos facilita la separación de especies iónicas y también de especies neutras. No obstante, este mecanismo de separación acoplado con el ICP-MS, no posibilita la detección de los compuestos inorgánicos de selenio ya que eluyen en el volumen muerto. Para la separación de este tipo de compuestos, el empleo de la cromatografía de intercambio iónico constituye la mejor técnica de separación. Por otra parte, con el empleo de la cromatografía de intercambio aniónico, la selenocistina eluye en el volumen muerto y coeluye con selenometionina oxidada. El empleo de un modo mixto de HPLC, combinando la cromatografía de intercambio iónico y la de fase inversa

constituye una buena alternativa para la resolución de los problemas mencionados. ,. Así, Peachy et al²²⁷. consiguieron separar selenocistina, seleno-metil-selenocisteína, selenometionina, ácido metilselénico, γ -glutamil-metil-selenocisteína y selenato usando el modo mixto de HPLC-ICP-MS en un cromatograma de 20 minutos.

CE-ICP-MS

La principal ventaja del análisis mediante CE es la capacidad de esta técnica de separación para el análisis diferentes tipos de muestra por proporcionar una elevada resolución para cationes, aniones y pequeños iones metálicos, complejos de metales con ligandos orgánicos, compuestos organometálicos y macromoléculas. Estas características han hecho de la CE una técnica muy útil para la especiación de selenio. A pesar de su alta eficacia y versatilidad, el pequeño diámetro del capilar y los bajos volúmenes de muestra limita la obtención de bajos límites de detección⁵⁷. Otro problema que se presenta en el uso de CE es la pérdida de analitos por adsorción química o por captura en la doble capa eléctrica de las paredes del capilar⁵⁷. El acoplamiento de CE al ICP-MS presenta complicaciones otros problemas como son²³⁰:

- Mantener la conexión eléctrica en ambos extremos del capilar.
- El flujo que emerge del capilar tiene que ser adaptado a los requerimientos de flujo del ICP-MS, lo que influye directamente en la resolución.

CE se ha utilizado, en la especiación, de selenio como parte de las separaciones bidimensionales⁵⁷. Mounicou *et al.*²²¹ colectaron las fracciones obtenidas por exclusión molecular de un extracto de levadura y posteriormente fueron separadas y detectadas por CE-ICP-MS. Así se lograron separar los siguientes compuestos: seleniato, selenito, selenocistina, selenometionina y selenoetionina.

Day *et al.*²²⁸ utilizaron CE-ICP-MS para la separación de los isómeros de selenometionina usando el reactivo Marfey.

GC-ICP-MS

En la cromatografía de gases (GC) se requiere de una línea de transferencia como interfase entre el GC y el ICP-MS. Esta línea de transferencia requiere calentamiento para evitar la condensación de los analitos volátiles²²⁹. El uso de vidrio o cuarzo^{230,231}

para la fabricación de las líneas de transferencia proporciona una superficie inerte y minimiza la adsorción o la condensación de los analitos.

Debido a la elevada eficiencia de transporte, GC-ICP-MS es más sensible que HPLC-ICP-MS y CE-ICP-MS para la especiación de los selenocompuestos²³². Las especies volátiles más abundantes encontradas en muestras biológicas y medioambientales son los metilseleniuros (ver Tabla 3) que se analizan habitualmente mediante GC. Donard et al.^{233,234,235} analizaron compuestos volátiles de selenio empleando un sistema de purga y atrapamiento criogénico. También se ha empleado la microextracción en fase sólida (SPME) para los compuestos volátiles de selenio²³⁶.

Se han analizado también compuestos no volátiles de selenio usando GC mediante derivatización previa de los analitos. Yang et al.²³⁷ derivatizaron la selenometionina con bromuro de cianógeno. Vondeheide et al.²³⁸ derivatizaron previamente con isobutilcloroformiato y luego extrajeron los compuestos de Se mediante SPME para separar selenometionina, selenoetionina y selenocistina mediante GC..

En la especiación de selenio mediante GC también se pueden obtener separaciones quirales. Mendez et al.²³⁹ usaron como agente derivatizante N-trifluoroacetil-O-isopropil y los compuestos se separaron usando una columna con fase estacionaria quiral: L-valina-tert-butilamida modificada polidimetilsiloxano (Chirasil-L-Val). En este estudio se separaron los isómeros de una disolución parenteral selenometionina y de una levadura comercial selenizada.

Detección de las especies de selenio mediante empleo de espectrometría de masas molecular

La fuente de ionización del ICP-MS es una fuente de ionización dura, lo que conlleva la pérdida de información estructural de los compuestos pero sin embargo, proporciona unos bajos límites de detección de numerosos elementos. En los estudios de especiación con el ICP-MS previamente a su detección se usa una técnica de separación de los compuestos. La identificación de las especies se realiza mediante comparación de los tiempos de retención de los analitos y los patrones. Para una identificación inequívoca de las especies²⁴⁰ se recomienda el empleo de al menos dos técnicas con mecanismos diferentes de separación.

Uno de los principales problemas de los estudios de especiación es la falta de patrones para ciertas especies. El ICP-MS al no aportar información estructural, no permite llevar a cabo la identificación de las especies en ausencia de patrones. Por ello, el empleo de técnicas de espectrometría de masas molecular, como ESI-MS/MS, es necesaria para obtener información estructural de las especies.

ESI (ionización por electrospray) consiste en una fuente de ionización suave que produce iones moleculares sin fragmentaciones significativas. Actualmente, la técnica ESI-MS ha sustituido a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) ya que requiere volúmenes de muestra inferiores y una menor purificación de los extractos. En situaciones donde no se pueda emplear ESI-MS, se utiliza el MALDI (desorción/ionización laser asistida por la matriz), a pesar de requiere la inmovilización previa de la muestra.

Cuando se utiliza ESI-MS u otra técnica de espectroscopía de masas que produzca iones moleculares, la información estructural se consigue mediante el empleo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

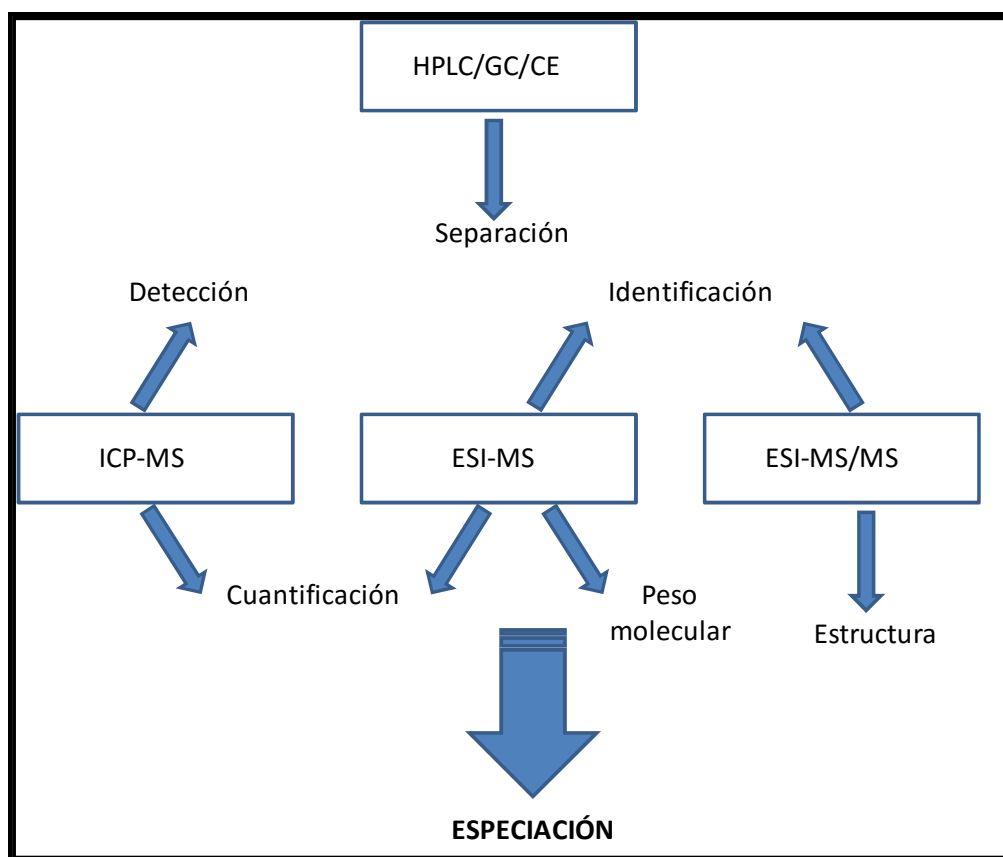


Figura 8. Contribución de diferentes herramientas analíticas al campo de la especiación

Los elevados límites de detección, en comparación con el ICP-MS, constituye la principal desventaja de ESI-MS ya que no permite la identificación especies que estén a niveles de ultra-trazas. De hecho, en la mayoría de los estudios con muestras biológicas, se requiere aplicar técnicas de preconcentración previas al análisis por ESI-MS. Otra de las desventajas de ESI-MS es la supresión de la señal del analito en las matrices complejas. La presencia de elevados contenidos en sales, que pueden estar presentes en las disoluciones reguladoras de HPLC o en los electrolitos de CE, suprimen la ionización de los analitos y por lo tanto originan una disminución en la intensidad de la señal analítica. La técnica MALDI-MS se ha aplicado como alternativa cuando la matriz de la muestra supone un problema para la detección e identificación por ESI-MS.

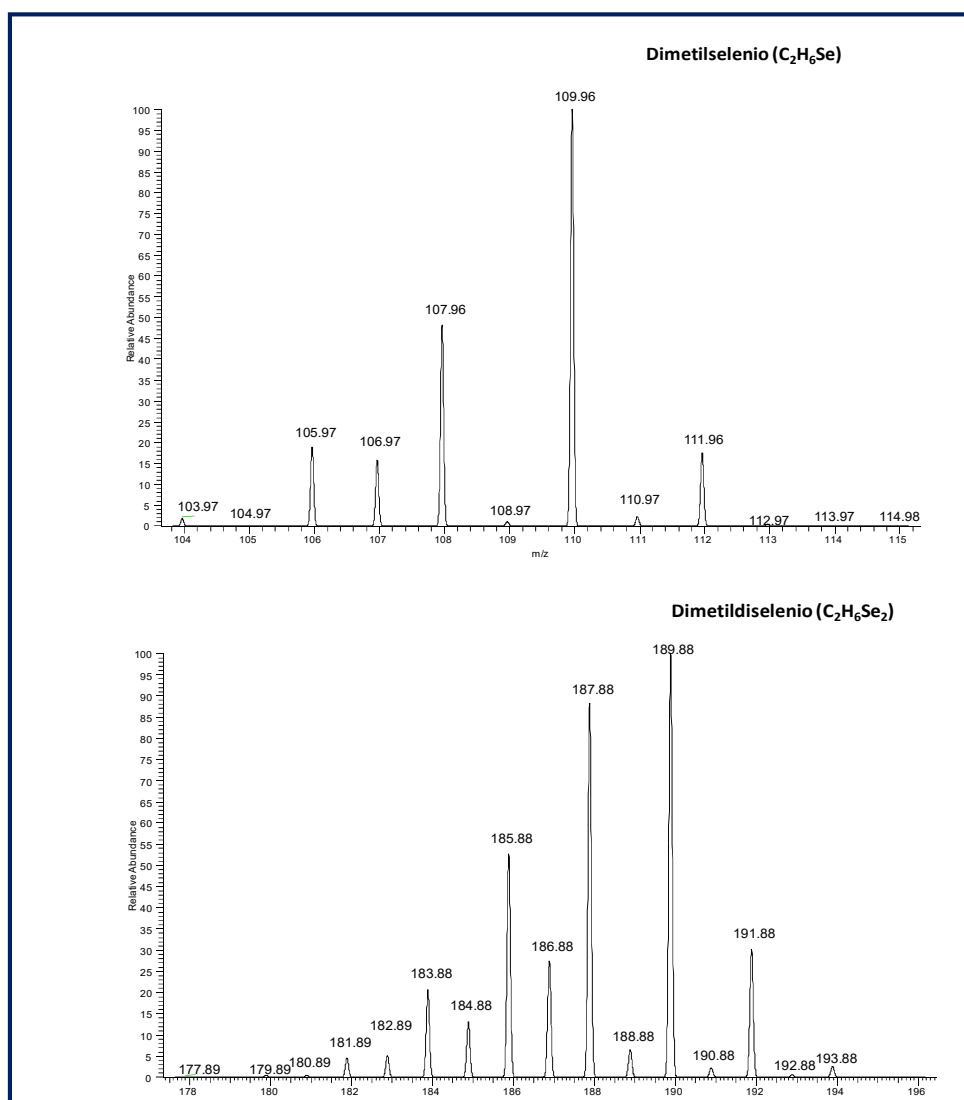


Figura 9. Perfil isotópico de dimetilselenio y dimetildiselenio

Se han realizado varios estudios de especiación de selenio en los que la información obtenida por el ICP-MS se complementa con la proporcionada por el ESI-MS. Muchos de estos estudios se han realizado en patrones, levadura y en extractos de plantas puesto que las concentraciones de selenio en estos tipos de muestra son significativamente mayores que en los tejidos y los fluidos biológicos

La identificación de los compuestos de selenio en muestras biológicas es posible debido al perfil isotópico característico del selenio (Ver Figura 9).

6.3 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SUS ESPECIES

Las técnicas para la determinación de las especies de mercurio son muy variadas, tal y como se esquematiza en la Figura 10. A continuación se describen en detalle algunas de las técnicas empleadas para la determinación de las especies de mercurio.

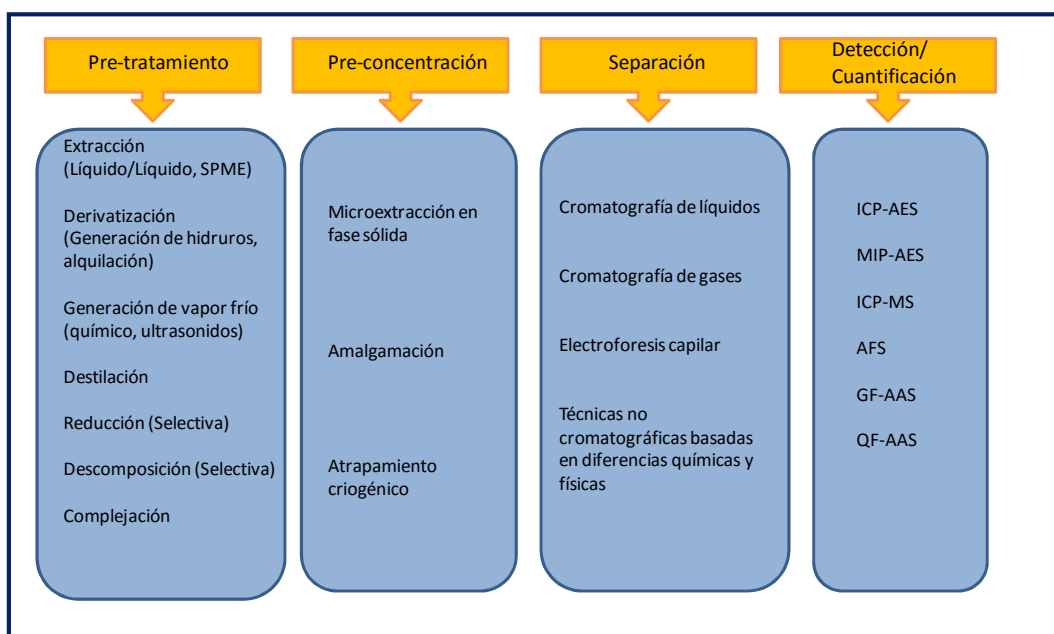


Figura 10. Técnicas para el pre-tratamiento, preconcentración, cuantificación y detección de las especies de mercurio

Tratamiento de la muestra

Los métodos más comunes para la extracción de las especies de mercurio son la extracción ácida, la destilación y la extracción alcalina.

La extracción ácida en combinación con la extracción con disolventes fue propuesta por Westöö²⁴¹ para la extracción de metilmercurio en muestras de alimentos. En dicho método la muestra se pone en contacto con HCl concentrado y posteriormente se realiza la extracción en benceno. Para llevar las especies de mercurio a la fase acuosa, estas se transforman en hidróxidos, mediante hidróxido amónico, en una fase acuosa saturada con sulfato sódico.

Con el fin de facilitar la transferencia de fase se usan comúnmente cisteína, tiosulfato u otros compuestos con grupos tiólicos,²⁴² debido a que muchas veces, antes de separar los compuestos mediante cromatografía de gases, la fase acuosa se acidifica con HCl para su reextracción en benceno antes del análisis.

Se han llevado a cabo varias modificaciones del método de Westöö: en medio ácido mineral, NaCl^{243,244}, KBr²⁴⁵⁻²⁴⁷ y ácido iodoacético^{248,249}, usando extracciones sucesivas con compuestos orgánicos como el benceno^{250,251}, tolueno^{252,253}, cloroformo^{245,254} o diclorometano^{255,256}.

Varios autores recomiendan una reextracción a un medio acuoso con el objetivo de limpiar y preconcentrar las especies extraídas usando para ello cisteína o tiosulfato sódico^{241,253}.

La destilación constituye otra de las estrategias utilizada para la extracción de especies de mercurio, inicialmente propuesta por Nagase et al.²⁵⁷ y Horvat et al.²⁵⁸ Para ello, la muestra sólida se trata con H₂SO₄ diluido o HCl en presencia de un exceso de NaCl y la mezcla se calienta a 150°C. Emplearon este método de extracción para la separación no cromatográfica de mercurio inorgánico y metilmercurio. La formación “artificial” de metilmercurio por la presencia de sustancias orgánicas naturales, tanto en aguas como en sedimentos, es una de las desventajas del método.

La digestión alcalina, utilizando KOH-metanol²⁵⁹ o hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)²⁶⁰, se ha propuesto como método de extracción de metilmercurio de muestras biológicas y sedimentos. Se ha observado que el tratamiento con TMAH en muestras de pescado provoca la formación *artificial* de dimetilmercurio lo que constituye una fuente de error en la identificación y cuantificación de las especies de mercurio²⁶¹.

La extracción con fluidos supercríticos también se ha empleado para la extracción de metilmercurio en sedimentos^{262,263}.

Los métodos tradicionales de extracción (digestión ácida, alcalina y destilación), anteriormente comentados para las especies de mercurio son complejos y tienen una baja eficiencia con un consumo elevado de disolventes y riesgo de pérdidas de especies. Además, métodos como la destilación y la extracción alcalina pueden formar metilmercurio de forma *artificial* a partir del mercurio inorgánico²⁶⁴.

La extracción asistida por microondas²⁶⁵ empleando ácidos^{266,267} y disolventes orgánicos²⁶⁸ se ha utilizado como método alternativo para la extracción de metilmercurio en sedimentos, y de especies de mercurio en pescado (usando como disolución extractante una mezcla de 2-mercaptoetanol y L-cisteína²⁶⁹).

La sonda de ultrasonidos constituye otra alternativa utilizada por su capacidad de acelerar y mejorar la eficiencia de la extracción de los compuestos de mercurio en pescado²⁷⁰.

La hidrólisis enzimática se ha aplicado para la extracción de las especies de mercurio dada la eficiencia de la tripsina²⁷¹, proteasa XIV, lipasa y/o celulasa²⁷²⁻²⁷⁵, pronasa²⁷⁶, pronase E^{277,278} y subtilisina²⁷⁹ para la extracción de metales en varios tejidos. Este tipo de hidrólisis ofrece la ventaja de actuar específicamente en los enlaces químicos, evitando la alteración de la forma química de las especies de mercurio. Se ha empleado tanto proteasa XIV²⁸⁰, como una mezcla de proteasa XIV y lipasa²⁸¹ para la extracción de especies de mercurio en muestras de pescado.

La extracción con compuestos con grupos sulfhidrilo, dada su afinidad por los compuestos de mercurio, constituye otro método de extracción alternativo de especies de mercurio. El empleo de extractantes tanto de 2-mercaptoetanol²⁶⁴ como de L-cisteína²⁸² han proporcionado recuperaciones cuantitativas de las especies de mercurio en pescados.

El empleo de técnicas de preconcentración de especies de mercurio (extracción líquido-líquido²⁸³, microextracción en fase sólida²⁸⁴ y atrapamiento criogénico²⁸⁵) se han utilizado con frecuencia debido a la baja concentración (del orden de pg L^{-1}) del mercurio en las muestras.

Determinación de especies de mercurio

En la etapa de separación, las técnicas más empleadas son las cromatográficas, aunque existen algunos sistemas no cromatográficos para la separación y determinación de las especies de mercurio una vez extraídas de la matriz.

Métodos no-cromatográficos

Uno de los métodos más sensibles y selectivos, para la cuantificación de mercurio, es la técnica de vapor frío acoplado a la espectrometría de absorción atómica (CV-AAS) o a la fluorescencia atómica (CV-AFS). La mayoría de los métodos no cromatográficos están basados en una reducción diferencial con cloruro estannoso (Hg inorgánico) y NaBH_4 (Hg total) de los extractos. Por lo general, la determinación del contenido de mercurio orgánico en la muestra se lleva a cabo por diferencia entre el contenido total y el inorgánico²⁸⁶.

Los compuestos orgánicos de mercurio también se pueden reducir a mercurio elemental empleando una mezcla de $\text{SnCl}_2\text{-CdCl}_2$ ²⁸⁷ o con $\text{SnCl}_2\text{-NaBH}_4$ ^{288,289} y $\text{FeCl}_3\text{-NaBH}_4$ ²⁹⁰.

El mercurio inorgánico y el mercurio total se han determinado en muestras de pescado usando diferentes tratamientos oxidativos (KBr/KBrO_3) y CV-AFS después de una extracción asistida por ultrasonidos

El mercurio inorgánico y el mercurio orgánico se pueden separar usando distintos tipos de fases sólidas, como polianilina²⁹¹, fibras de algodón de sulfhidrilo²⁹², 2-mercaptoetanol cargado en un gel de sílica²⁹³. Tanto el mercurio orgánico como el inorgánico también se pueden separar mediante complejación con diferentes ligandos (fosfato o carbamatos), retención posterior en soportes sólidos y finalmente detección mediante ET-AAS, CV-AFS o CV-AAS.

La determinación selectiva de metilmercurio en alimentos se ha realizado mediante microextracción en fase sólida en espacio de cabeza GC y posterior detección por espectrometría de absorción atómica²⁹⁴. Para la determinación de metilmercurio en muestras de pescado la generación del vapor frío (con cloruro estañoso o borohidruro) y la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza se han aplicado tras una extracción previa asistida por ultrasonidos²⁹⁴.

La oxidación mediante sonolisis se ha empleado para la conversión de los compuestos orgánicos de mercurio en mercurio inorgánico y la subsiguiente

determinación mediante FIA-CV-AAS después de la reducción del mercurio inorgánico con NaBH_4 o SnCl_2 ²⁹⁵.

La generación de vapor frío en la fase orgánica tras una extracción líquido-líquido en xileno y detección mediante ICP-AES²⁹⁶ constituye otra alternativa de determinación de metilmercurio y se ha aplicado a aguas de mar y orinas. Ambos procesos de separación, líquido-líquido y gas-líquido) se realizan on-line.

La electroforesis capilar se ha empleado como técnica complementaria a la cromatografía de gases y a la cromatografía de líquidos. La separación mediante electroforesis capilar es más rápida y eficiente que la cromatografía de líquidos. La desventaja de la electroforesis es el elevado límite de detección debido al pequeño volumen de inyección. Para mejorar los límites de detección de la electroforesis capilar, al igual que en el caso del selenio, se tiende a desarrollar métodos de pre-concentración o a acoplar la electroforesis capilar a detectores más sensibles.

Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos permiten, por lo general, separar en una sola etapa todos los compuestos de mercurio.

Cromatografía de gases:

Es la técnica más utilizada de especiación de mercurio debido a su elevada resolución, fácil manejo y facilidad de acoplamiento a un gran número de detectores.

Inicialmente se empleaban columnas de longitud y diámetro interno variable (15-30m y 0.3-0.75 cm ID respectivamente) empaquetadas con OV 101 absorbido sobre un soporte sólido de Chromosorb W-HP²⁹⁷ o columnas de vidrio silanizado empaquetadas con DEGS-PS al 5%²⁹⁸. Este tipo de columnas, sin embargo, presentaban varios problemas causados por procesos de adsorción y de intercambio iónico (debidos al carácter polar de los haluros de mercurio): aparición de colas en los picos cromatográficos, cambio en los tiempos de retención y disminución de las áreas y las alturas de los picos. La pasivación de la columna cromatográfica con HgCl_2 en tolueno o benceno, a pesar del riesgo inherente al uso necesario de elevadas concentraciones de Hg (II) ²⁹⁹ se propuso como alternativa para paliar en gran medida los problemas anteriormente mencionados.

Actualmente se tiende al empleo de columnas capilares, de tipo no-polar y recubiertas con una fina capa de fenil o metil silicona³⁰⁰ ya que proporcionan

separaciones más eficientes y con mejor resolución que las mencionadas anteriormente. Una desventaja de este tipo de columnas es que el volumen de muestra que admiten es muy pequeño (entorno a 1 μL).

Otra alternativa a la problemática anterior es la derivatización pre-columna de las especies de mercurio con el objetivo de transformarlas en dialquilderivados no polares. Los métodos más utilizados para la derivatización de las especies de mercurio son la yodación con ácido yodoacético^{248,249}, generación de hidruros con NaBH_4 ^{266,301-303}, etilación con NaBEt_4 ^{255,304} y derivatización con un reactivo Grignard (etilación, butilación y propilación)³⁰⁵.

La etilación en fase acuosa y posterior separación y detección con GC-CV-AFS ha sido el método más usado. Las especies etiladas son volátiles al igual que el mercurio elemental y el dimetilmercurio, por ello se purgan desde la disolución a temperatura ambiente y se colectan en adsorbentes como Carbotrap o Tenax. Tras la liberación térmica de los compuestos, éstos se transfieren al cromatógrafo de gases²⁹⁹. Los compuestos etilados también se pueden inyectar directamente en el cromatógrafo de gases mediante inyección en espacio de cabeza^{306,307} o mediante crioatrapamiento^{228,308}. Un inconveniente de la etilación es la formación artificial de metilmercurio²⁷⁴, y además si en la muestra hay elevadas cantidades de cloruros el metilmercurio se puede convertir en mercurio elemental³⁰⁹. La imposibilidad de poder distinguir entre especies de mercurio inorgánico, especies que pueden coexistir en determinadas muestras medioambientales constituye otro de los inconvenientes de la etilación³¹⁰. Para solventar estos problemas De Smaele et al. propusieron el uso de tetrapropilborato de sodio (NaBPr_4) como agente derivatizante³¹¹ Y otros autores el tetrafenilborato de sodio (NaBPh_4)^{312,313,314}. El NaBH_4 también se ha utilizado como derivatizante para formar los correspondientes hidruros de las distintas especies de mercurio³⁰².

Cromatografía de líquidos:

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una alternativa a la cromatografía de gases. Aunque el acoplamiento de esta técnica a distintos detectores proporciona menor sensibilidad que la GC, por la peor eficiencia en el proceso de introducción de muestra en detectores específicos como el ICP-MS. Permite la separación de especies polares de mercurio por lo que la convierte en una buena

alternativa para la separación de los compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio. La versatilidad es mayor que la cromatografía de gases ya que ofrece más mecanismos de separación y sin tener que recurrir a etapas previas de derivatización²⁹⁷.

La mayoría de los métodos de HPLC que se emplean para separar las especies de mercurio se basan en la modalidad de fase inversa con un modificador orgánico en la fase móvil²⁹⁹. Con el fin de mejorar la separación cromatográfica y/o evitar la adsorción de las especies de mercurio en la fase estacionaria generalmente se emplean agentes complejantes como la cisteína o β -mercaptoetanol o agentes formadores de paresiónicos^{297,315}.

Para solventar el problema de la falta de sensibilidad se han empleado técnicas de derivatización post-columna para formar el vapor frío de mercurio. La generación del vapor frío de mercurio requiere convertir previamente la especie de mercurio en Hg (II). Estas etapas de conversión se suelen realizar on-line y se suelen llevar a cabo a través del empleo de:

- Oxidación con dicromato potásico en presencia de sulfato de cobre³¹⁶ o cadmio³¹⁷.
- Empleo de radiación ultravioleta con y sin peróxido de hidrógeno^{318,319}.
- Oxidación con persulfato ácido de potasio en presencia de sulfato de cobre³²⁰.

La cromatografía de intercambio iónico también se ha utilizado para separar las especies de mercurio^{321,322}.

Métodos de detección

En el primer trabajo sobre la especiación de mercurio se utilizó la cromatografía de gases con un detector ECD²⁹⁹. Pero su baja sensibilidad favoreció la búsqueda de otros detectores como el empleo del GC-MIP-AES^{323,324}.

Otro de los detectores empleados frecuentemente para la determinación de los compuestos de mercurio debido a su sensibilidad y especificidad son CV-AAS, ET-AAS, CV-AFS²⁹⁷ e ICP-MS. Este último es uno de los más utilizados para la determinación del mercurio, no solo por su alta sensibilidad y selectividad sino también por su capacidad

de realizar análisis por dilución isotópica, y acoplarse fácilmente a sistemas de separación de HPLC y GC²⁹⁹.

Otro de los analizadores de masas que se ha empleado para la especiación de mercurio es el de tiempo de vuelo acoplado con GC³²⁵.

7. BIOACUMULACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA: DETERMINACIÓN DE FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN

La Unión Europea (UE), con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo derivado de los productos químicos durante todo su ciclo de vida (fabricación, envasado, distribución, transporte, comercialización, utilización y eliminación), ha promulgado y desarrollado directivas específicas que unifican las condiciones de su comercialización en todos los estados miembros. Una de las categorías definidas por la Unión Europea para clasificar la peligrosidad de una sustancia química (compuesto o preparado) es su efecto sobre el medio ambiente, incluyendo aspectos como ecotoxicidad, movilidad, persistencia y degradabilidad, potencial de bioacumulación, toxicidad acuática, etc.

La Unión Europea recientemente ha desarrollado una nueva normativa europea de Registro de Productos Químicos (REACH), cuyo principal objetivo es paliar la escasez de conocimiento sobre los efectos que las sustancias químicas tienen sobre la salud humana y el medioambiente. Esta nueva normativa ha entrado en vigor en junio de 2007. Concretamente, en el REACH se indica que la bioacumulación de una sustancia química en un organismo, es una de las propiedades intrínsecas más importantes que determinan el potencial de peligro para el medio ambiente, y se señala que se requerirán datos del potencial de bioconcentración para un gran número de compuestos químicos con producciones superiores a las 100 Tm/año. En este sentido, y según un estudio de Pedersen *et al.*³²⁶, se estima en más de 3.000 los compuestos químicos de los que se deberán aportar datos de bioconcentración, obtenidos siguiendo el único método validado actualmente, y que es el Test de Bioconcentración de la OCDE (OCDE/305), que mide la acumulación de un compuesto disuelto en agua en peces adultos. La obtención del factor de bioconcentración (BCF) de un compuesto, siguiendo ese método, implica llevar a cabo un complejo ensayo con

peces, cuyo coste se estima en más de 100.000 € por compuesto, siendo requeridos al menos 108 peces por ensayo para poder obtener cada dato de interés.

7.1 MEDIDA EXPERIMENTAL DEL FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (BCF)

Como se ha comentado anteriormente, el ensayo aceptado para determinar de forma experimental los BCFs es el Test de la OCDE 305.

El test consiste en dos etapas: a) de exposición y b) de depuración. Durante la etapa de exposición, un número suficiente de peces se exponen a dos niveles de concentración de la sustancia a estudiar. Esta etapa de exposición tiene una duración de 28 días a no ser que se consiga el equilibrio antes, o una duración de 60 días si el equilibrio no se ha conseguido tras esos 28 días. Finalizada la etapa de exposición, los peces se transfieren a otro acuario con agua limpia, comenzando la segunda fase del test o fase de depuración.

El Test de la OCDE 305 define BCF como el cociente entre la concentración de una sustancia química en el organismo y la concentración de esa misma sustancia en el agua, una vez alcanzado el equilibrio. La cinética del proceso de bioconcentración se puede describir como un modelo de dos compartimentos (agua y organismo acuático) y de primer orden. Por lo tanto, la variación de la concentración de una sustancia química en los peces se puede describir mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f \quad (\text{Ecuación 1})$$

k_1 es la constante de la fase de exposición ($L \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$), k_2 es la constante de la fase de depuración (h^{-1}), C_w ($mg \cdot L^{-1}$) es la concentración de la sustancia química en agua, y C_f es la concentración de la sustancia química en el pez (mg/kg peso húmedo).

Si C_w es constante durante el periodo de exposición, la ecuación 1 se puede simplificar a la ecuación 2:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Cuando se alcanza el equilibrio, la ecuación 2 se puede reducir a la ecuación 3:

$$C_f/C_w = BCF_k = k_1/k_2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

La eliminación o depuración de las sustancias químicas, de los organismos acuáticos y terrestres, normalmente sigue una cinética de primer orden y que puede ser descrita por la ecuación 4:

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde $C_{f,0}$ es la concentración al inicio del periodo de depuración y k_2 , como en la ecuación 1, es la constante de depuración.

7.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS AL ENSAYO OCDE 305

Actualmente se están buscando métodos alternativos al ensayo OCDE 305 puesto que este test requiere el sacrificio de 108 peces como mínimo, largos tiempos de exposición tiempo para llevar a cabo el ensayo y su coste es muy elevado. Como métodos alternativos se han desarrollado técnicas de métodos *in vitro* y QSAR que se detallan a continuación.

Métodos *in vitro*

La bioaccesibilidad y biodisponibilidad de las sustancias químicas en los sistemas *in vitro* son aspectos esenciales para establecer su potencial efecto tóxico. Por un lado, la unión de las sustancias lipofílicas, al material de plástico, a las proteínas del sistema o a ambos reduce la concentración de la sustancia libre en disolución. Gülden y Seibert demostraron que la distribución de los xenobióticos entre el agua, lípidos, y el suero del medio de cultivo altera en gran medida la biodisponibilidad de los compuestos químicos y es el factor que más influye en la correlación entre el sistema *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, la unión a proteínas puede originar una variación en su metabolismo y facilita la absorción. Con el fin de obtener una buena aproximación con

los datos *in vivo*, los resultados *in vitro* se deben expresar como concentración libre de los compuestos químicos en vez de la concentración nominal.

Se han empleado varias técnicas *in vitro* para evaluar la absorción y biotransformación de los compuestos químicos en peces, las cuales se discuten a continuación:

Órganos

El intestino se ha empleado para examinar la absorción de los compuestos procedentes de la comida o de otros materiales ingeridos, la contribución a la biotransformación por parte del intestino y la influencia de la biotransformación en la absorción. Esta metodología se ha aplicado al estudio de la biodisponibilidad de xenobióticos en pez gato y pez sapo. Las agallas de los peces se han empleado para estudiar la absorción de las sustancias químicas en el medio y el papel que ejerce el metabolismo bronquial en la absorción. El hígado es otro de los órganos importantes utilizados ya que aporta información sobre la biotransformación y excreción de los contaminantes. Una de la desventaja del empleo de estos órganos es que son solo viables durante unas horas pero aún así la información que proporcionan sobre absorción, biotransformación y excreción está muy relacionada con la información obtenida mediante el empleo de peces adultos.

Cortes de tejidos

Los cortes de tejido de hígado ofrecen la ventaja de mantener la arquitectura del tejido y la integración de los hepatocitos y no-hepatocitos, lo cual es importante para asemejar el metabolismo de los xenobióticos en los cortes de tejido de hígado con el metabolismo de los xenobióticos en un organismo completo. La desventaja principal de esta metodología se debe a que la difusión de los compuestos puede crear gradientes de concentración que influyan en el metabolismo y compliquen por tanto la extrapolación de los resultados *in vitro* con los resultados *in vivo*.

Embriones de peces

El empleo de embriones de peces es una estrategia bastante atractiva ya que la legislación Europea no los considera como animales de laboratorio por lo que su uso para la realización de test de toxicidad aguda se ha extendido considerablemente.

En la presente Tesis Doctoral se va a utilizar como modelo alternativo al ensayo OCDE 305 larvas del pez cebra (Ver Figura 11) por presentar una serie de ventajas:

- Los estadios más tempranos de su desarrollo (embriones y larvas de hasta seis días post-fertilización) no se consideran como animal de laboratorio según la Directiva 86/609/EEC.
- Puestas a lo largo de todo el año y elevado número de embriones por hembra.
- Bajos costos de mantenimiento.
- Se pueden tratar con pequeñas cantidades del compuesto a testar.
- Rápido desarrollo embrionario lo que permite acortar la duración de los ensayos.
- El pez cebra comparte más del 80% del código genético con el ser humano facilitando así la extrapolación de los resultados.
- Su transparencia permite observar fenotipos con microscopio óptico.
- Su sincronización en las divisiones celulares es importante para el estudio de compuestos antitumorales.



Figura 11. Pez cebra (*Danio Rerio*)

Petersen y Kristensen realizaron un estudio relativo a la bioconcentración de seis hidrocarburos aromáticos policíclicos (*naftaleno, fenantreno, pireno, PCB 31 y PCB 105*) en embriones y larvas de peces cebra y de otras especies de peces (rodaballo, arenque y bacalao). Utilizando un modelo de acumulación de primer orden ($dC_f/dt =$

$k_1C_w - k_2C_f$) obtuvieron valores para k_1 (tasa de acumulación) y para k_2 (tasa de eliminación) algo diferentes entre estadios embrionarios y eleuteroembriones, aunque los valores finales de bioconcentración fueron para ambos bastante similares. La buena correlación entre los datos obtenidos en estos estadios embrionarios con los publicados en estadios adultos de diferentes especies de peces, sugiere que tanto las larvas como los embriones de pez cebra, pueden constituir una buena alternativa al ensayo de bioacumulación OECD 305.

Cultivos celulares primarios

Los cultivos primarios de células aisladas de hígado, intestino y agallas son muy útiles a la hora de estudiar la absorción y biotransformación de compuestos químicos así como los efectos de los inductores e inhibidores de estos procesos. La ventaja de usar células intactas en vez de fracciones subcelulares es que las células intactas pueden dar información sobre los procesos de transporte de membrana (mecanismos de transporte activo y pasivo) y de compartimentalización celular.

Los cultivos celulares primarios más utilizados son los de células aisladas de hígado, aunque también se han utilizado células aisladas de agallas para el estudio del metabolismo de xenobióticos.

Líneas celulares inmortalizadas

Varias líneas celulares inmortalizadas derivadas de hígados de peces normales o neoplásicos (RT1-W1 de *Oncorhynchus mykiss*, PLHC-1) han demostrado poseer capacidades metabólicas, aunque la velocidad del metabolismo y los niveles de expresión de las enzimas metabólicas son menores que en los cultivos celulares primarios de hígado. La principal ventaja de estos sistemas es su disponibilidad y reproducibilidad y su desventaja es que la velocidad de metabolización y los mecanismos metabólicos no tienen porque reflejar la capacidad de biotransformación de los tejidos de los cuales se originan estas líneas celulares.

Fracciones subcelulares

Las fracciones subcelulares como la mitocondria, los microsomas y el citosol son fáciles de preparar y no requiere un costo muy elevado.

Las fracciones subcelulares son muy adecuadas para el estudio de biotransformaciones específicas o para realizar un “screening” entre las sustancias que tienen un alto potencial de biotransformación frente a las que lo tienen bajo. Se han

empleado fracciones de diferentes partes de la célula para evaluar la biotransformación en hígado, riñón, intestino, agallas y otros órganos de peces.

Modelos QSAR (Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad)

Otro de los métodos alternativos para determinar la capacidad de bioconcentración de un compuesto es la correlación de las propiedades físicas o estructurales de los compuestos químicos con los BCFs. Los modelos QSAR se han desarrollado con el objetivo de predecir la bioconcentración empleando datos de BCF ya existentes. El método más común para estimar la bioconcentración de una sustancia es el establecimiento de correlaciones entre el BCF y la hidrofobicidad de los compuestos químicos, usando el coeficiente de partición n-octanol/agua ($\log K_{ow}$). La mayoría de las relaciones entre el BCF y el $\log K_{ow}$ son modelos de regresión lineal, pero para compuestos químicos muy hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 6$) suelen ser modelos de regresión no-lineal o modelos polinómicos.

8. PROTEÓMICA CUANTITATIVA PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DE LOS ELEMENTOS TRAZA

La contaminación de los ecosistemas y la exposición a metales tóxicos (debido a actividades naturales y/o antropogénicas³²⁷) constituye una preocupación social y científica. Aunque algunos de esos metales son micronutrientes esenciales a bajas concentraciones, su presencia en exceso puede tener efectos adversos sobre la salud.

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo para evaluar la toxicidad de los metales pesados se han centrado en el desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de especies tóxicas en distintas muestras, principalmente usando técnicas de análisis elemental (absorción y emisión atómica, ICP-MS, siendo esta última la más ampliamente utilizada para el análisis multi-elemental y la especiación)³²⁸. Sin embargo hay pocos estudios relacionados con los mecanismos de toxicidad de los metales pesados y la manera en que estos metales interaccionan con los organismos vivos. Por este motivo en la presente Tesis Doctoral se ha querido aplicar técnicas de proteómica cuantitativa para estudiar en más profundidad los mecanismos de toxicidad de los metales pesados, en este caso del mercurio.

En los últimos años, las mejoras sustanciales en la separación de proteínas y técnicas de identificación y la expansión de la genómica han provocado un incremento en la aplicación de los métodos de proteómica para responder cuestiones biológicas³²⁹. El campo de aplicación de la proteómica es amplio y engloba:

- La identificación y cuantificación de proteínas en células, tejidos y fluidos biológicos.
- análisis del cambio en la expresión de proteínas en sistemas normales *versus* sistemas perturbados.
- caracterización de modificaciones post-traduccionales.
- estudios de las interacciones proteína-proteína
- otras aplicaciones.

La proteómica, o el análisis sistemático de proteínas expresadas por un genoma, es una poderosa herramienta no solo para describir los proteomas completos a nivel de orgánulos, células, órganos o tejidos sino también para comparar proteomas afectados por diferentes condiciones fisiológicas (por ejemplo, la exposición a metales pesados u otros factores medio ambientales)²⁹⁷. La identificación de los cambios en las proteínas individuales o grupo de proteínas asociadas con la exposición a metales pesados podría ayudar a la comprensión de sus mecanismos de toxicidad.

Adkins et al.³³⁰ describieron a los biomarcadores como “proteínas capaces de cambiar sus niveles de concentración o estado debido a una enfermedad o un proceso biológico”. En los últimos años, el desarrollo y la implementación de las técnicas de proteómica ha crecido de manera exponencial dentro del campo de los biomarcadores proteicos³³¹. Hoy día se ha demostrado que la proteómica en combinación con diversas herramientas bioinformáticas puede facilitar el descubrimiento de nuevos biomarcadores relacionados con la exposición a metales³³².

Casi todos los estudios que utilizan estrategias de proteómica, para evaluar el efecto de los metales pesados en los organismos vivos, se basan en la identificación de los cambios que se producen en el proteoma como consecuencia de la exposición a los metales³³³ más que en la caracterización de interacciones específicas entre metal-proteína³³⁴.

8.1 METODOLOGÍAS EMPLEADAS EN PROTEÓMICA PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS

El principal objetivo de cualquier experimento de proteómica es obtener la máxima información posible, tanto cualitativa como cuantitativa, del proteoma.

La mayoría de las técnicas empleadas para el estudio de la toxicidad de los metales se basan en técnicas de separación en geles. La electroforesis en gel de dos dimensiones (2-DE) es la técnica que se utiliza normalmente para los estudios en proteómica relacionados con la toxicidad de los metales, ya que permite la resolución simultánea de miles de proteínas. La elevada resolución de 2-DE es debido a que la primera y la segunda resolución se basan en dos características de separación diferentes de las proteínas. En la primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), la proteínas se separan conforme a su carga, mientras que en la segunda dimensión las proteínas se separan ortogonalmente mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) conforme a su peso molecular³³⁵.

Después de la electroforesis en gel, las siguientes etapas consisten en teñir el gel y análisis de la imagen del gel para cuantificar cada proteína y permitir la comparación cualitativa entre muestras mediante densitometría tras un proceso de tinción. La tinción de las proteínas en el gel se puede llevar a cabo con diferentes reactivos: azul brillante de Coomassie (CBB)³³⁶⁻³⁴³, nitrato de plata^{297,344-352}. Las manchas o bandas seleccionadas, tras escanear el gel, se someten a la digestión trípica en gel y las proteínas se identifican por espectrometría de masas de los péptidos resultantes.

En la mayoría de las aplicaciones la técnica 2-DE ha sido acoplada con la degradación de Edman³⁵³ o con huella peptídica (PMF) utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF^{297,354,355}. La espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF^{349-352,356,357}) o LC-MS/MS^{340,358-360} facilita la identificación de las proteínas, puesto en la misma zona del gel se pueden encontrar numerosas proteínas, lo que hace que sus espectros sean bastante complejos.

La combinación de 2-DE con MS resulta una técnica laboriosa y difícil de automatizar. La técnica 2-DE está limitada por el número y el tipo de proteínas a resolver. Las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran en el gel durante la primera dimensión y las proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien³⁶¹, además de ser difícil la detección de proteínas poco abundantes. Algunos de

estos problemas se pueden resolver, en parte, usando estrategias de enriquecimiento como etapa previa a la separación electroforética, como por ejemplo, la técnica de inmunodepleción usando anticuerpos policlonales contra las proteínas más abundantes³⁶². Además, la precisión de la cuantificación de las proteínas en geles teñidos con plata se ve comprometida por el estrecho intervalo dinámico de la tinción y por las diferentes características de tinción que poseen las proteínas. Por otro lado, la reproducibilidad de los geles teñidos con plata es muy pequeña. La tinción con CBB, aunque es más adecuada para la cuantificación, es menos sensible que la tinción con plata³³⁵. Una manera de mejorar la detección en 2-DE es empleando marcadores fluorescentes³³⁵, aunque esta modificación no se ha empleado para el estudio de la toxicidad de los metales.

Uno de los principales problemas asociados con 2-DE es la reproducibilidad, debido a la elevada variabilidad que hay entre los geles. Para solucionar este problema se desarrolló la técnica DIGE (difference gel electrophoresis). En esta técnica las muestras se tiñen con diferentes marcadores fluorescentes, permitiendo así la comparación de las proteínas, pertenecientes a diferentes muestras, en un mismo gel. La adquisición de las imágenes fluorescentes de un gel DIGE permite una cuantificación relativa así como distinguir que proteínas están diferencialmente expresadas³⁶³. Aunque DIGE posee más ventajas que 2-DE, únicamente se ha utilizado en combinación con LC-MS/MS y MALDI-TOF para estudiar el efecto de la exposición con Cd en peces³⁶⁴ y plantas³⁶⁵.

En la electroforesis llamada “Blue Native” (BN), los complejos proteicos se solubilizan y se mezclan con un colorante (azul de Coomassie) el cual se unirá a los complejos proteicos antes de la separación PAGE. BN-PAGE separa a las proteínas de manera eficaz bajo condiciones nativas y permite también determinar cambios en un proteoma dado³³³. La combinación de BN-PAGE y SDS-PAGE se han empleado en el estudio de la toxicidad inducida por Cd³⁶⁶ y Mn^{367,368} en plantas.

Muchos de los problemas asociados con el empleo de geles se pueden resolver utilizando métodos que evitan el empleo de estos geles, como por ejemplo MudPIT (Multidimensional identification technology), basado en la generación de péptidos en disolución de una mezcla compleja de proteínas, seguido posteriormente de una separación cromatográfica bidimensional³⁶⁹. Normalmente se suele emplear una

cromatografía de intercambio catiónico como primera dimensión y como segunda dimensión se suele emplear una cromatografía de fase inversa³⁷⁰. Una de las desventajas de MudPIT es que en comparación con las técnicas de gel implica una pérdida de la información debido a que las identificaciones se basan únicamente en los espectros obtenidos sin tener en cuenta información adicional, como puede ser el peso molecular o el punto isoeléctrico.

En la década pasada se han desarrollado distintas estrategias de proteómica cuantitativa basadas en el marcaje de las proteínas y péptidos, como por ejemplo: ICAT (isotope-coded affinity tag)³⁷¹, SILAC (stable-isotope labeling by amino acids in cell culture)³⁷², iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)³⁷³, ICPL (isotope-coded protein label)³⁷⁴, marcaje N-terminal³⁷⁵, marcaje con agua pesada³⁷⁶ y técnicas que no requieren ningún marcaje (label-free methods)³⁷⁷. Aunque estas técnicas se han empleado bastante en proteómica, en estudios relacionados con la toxicidad de metales apenas se han utilizado, de hecho solo hay una publicación en la que se usa iTRAQ para identificar las proteínas afectadas por boro³⁷⁸. En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado tanto SILAC como iTRAQ para la cuantificación de proteínas afectadas por metilmercurio en células HepG2 y larvas de zebrafish.

8.2 METODOLOGÍAS EMPLEADAS EN PROTEÓMICA CUANTITATIVA

Los métodos clásicos de cuantificación utilizan colorantes, fluoróforos, o radioactividad y poseen elevada sensibilidad, linealidad y rango dinámico. Aspectos negativos de estas técnicas a destacar son: primero, requieren de una elevada resolución en la separación de las proteínas (esta separación se suele realizar con geles 2D), lo que limita su aplicabilidad a proteínas abundantes y solubles y segundo, estas técnicas no son capaces de revelar la identidad de las proteínas. Estos aspectos se solucionan con el empleo de técnicas LC-MS/MS³⁷⁹. La espectrometría de masas no es una técnica intrínsecamente cuantitativa debido a que los péptidos proteolíticos exhiben un amplio rango de propiedades fisicoquímicas como el tamaño, que provocan diferentes respuestas en el espectrómetro de masas. Por este motivo, para obtener información cuantitativa se requiere, generalmente, la comparación individual de cada péptido entre diferentes experimentos. En la mayoría de los esquemas de

proteómica la comparación entre péptidos se puede conseguir de diferentes maneras (ver Figura 11)³⁸⁴. Esta comparación se basa en el empleo de isótopos estables, en la cual un péptido marcado con un isótopo es químicamente idéntico al péptido nativo (sin marcaje) y por lo tanto los dos péptidos se comportan idénticamente durante la separación cromatográfica. Dado que un espectrómetro de masas puede reconocer la diferencia de masas entre el péptido marcado y sin marcar, la cuantificación se consigue comparando las señales de ambos péptidos³⁸⁴.

Los isótopos marcados se pueden introducir utilizando varias estrategias³⁸⁰:

- Marcaje Metabólico
- Marcaje Químico
- Marcaje Enzimático o por adición de péptidos sintéticos

Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias en las que no se emplea ningún tipo de marcaje (Label-free methods).

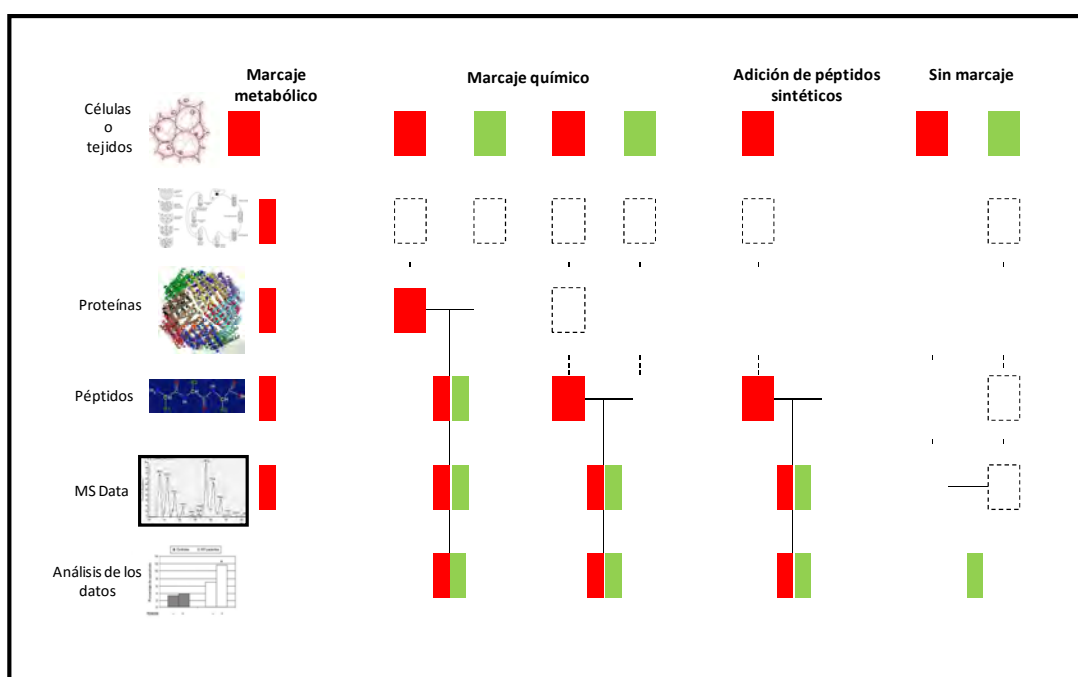


Figura 11. Esquema de metodología en espectrometría de masas cuantitativa. Los rectángulos en verde y rojo representan dos condiciones experimentales. Las líneas horizontales representan el momento en el que se combinan las muestras. Las líneas discontinuas indican donde pueden ocurrir los errores de cuantificación y la variación experimental. (Adaptado de Ong et al.³⁸¹)

Marcaje metabólico

En el marcaje metabólico se adicionan los isótopos durante la etapa de crecimiento y división celular, de esta manera éstos se incorporan en las proteínas que sintetiza la célula. Inicialmente, se desarrolló un marcaje en bacterias utilizando un medio de cultivo enriquecido en ^{15}N ³⁸². Este medio de cultivo enriquecido es caro y además es difícil de implementar en células de mamíferos, por lo que el método se ha limitado exclusivamente a microorganismos, que son capaces de crecer en ese medio. Adicionalmente, el grado de incorporación no tiene porque ser del 100% y además, como los diferentes aminoácidos varían en número de átomos de nitrógeno, conlleva que la interpretación de los espectros no sea una tarea sencilla³⁸³. Mann y colaboradores han propuesto una versión de la estrategia anterior basada en la adición de isótopos en forma de aminoácidos en el medio de cultivo, conocida con el nombre de SILAC (stable-isotope labeling by amino acids in cell culture)³⁸⁴. El medio de cultivo contiene $^{13}\text{C}_6$ -arginina y $^{13}\text{C}_6$ -lisina lo cual asegura que los productos de la digestión trípica de las proteínas contengan al menos un aminoácido marcado obteniéndose así un incremento de masa constante respecto a los péptidos sin marcar. La identificación de las proteínas se basa en los espectros de fragmentación de al menos uno de los péptidos del par “ligero” y “pesado”, y la cuantificación relativa se lleva a cabo mediante la comparación de las intensidades de la distribución isotópica de los péptidos obtenidos en el espectro de masas³⁷⁹. En la técnica SILAC, en comparación con el marcaje metabólico con ^{15}N , el número de isótopos marcados es definido y no depende de la secuencia del péptido, lo que facilita el análisis de los datos. La principal ventaja del marcaje metabólico es que las muestras se pueden combinar en el nivel de las células intactas, antes de empezar el tratamiento de la muestra (Ver Figura 11)³⁷⁹. En SILAC se puede conseguir un marcaje de más de un 90% con 6-8 doblajes de las células en un medio suplementado de aminoácidos pesados³⁸⁴, pero hay que tener en cuenta que algunas líneas celulares son sensibles a los cambios en la composición del medio de cultivo o son difíciles de mantener lo que dificulta el empleo del marcaje metabólico³⁷⁹. Otra limitación del marcaje metabólico es el número limitado de marcadores. Para SILAC solo pueden compararse en un experimento (sin marcar, marcados en $^{13}\text{C}_6$ y marcados en $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$) un máximo de tres condiciones. . Dado que las muestras se pueden combinar en una etapa muy temprana

(Ver Figura 11), el marcaje metabólico y SILAC en particular son probablemente las técnicas de proteómica cuantitativa más precisas y exactas teniendo en cuenta todo el proceso experimental³⁷⁹.

Marcaje de péptidos y proteínas

El marcaje post-biosintético de péptidos y proteínas se realiza mediante derivatización *in vitro* tanto enzimática como químicamente. Una estrategia para introducir el isótopo estable en los péptidos es llevar a cabo una digestión enzimática de la muestra en H_2^{18}O , mientras que la muestra control se digiere en H_2^{16}O . Este marcaje da como resultado la introducción de hasta dos ^{18}O en el grupo carboxilo terminal³⁸⁵. En principio, todas las serina proteasas como la tripsina, quimiotripsina y GluC son capaces de introducir ^{18}O ³⁸⁵. Esta estrategia posee sus limitaciones debido al elevado coste del agua marcada en ^{18}O , y a que la incorporación de ^{18}O puede no ser completa, además la diferencia de masas entre el péptido marcado y sin marcar (2 o 4 Da) no es muy grande lo que puede conllevar a que los espectros de masa solapen entre ellos³⁸⁶⁻³⁸⁹.

Las cadenas laterales de los aminoácidos también pueden resultar útiles a la hora de realizar un marcaje isotópico. Las cadenas laterales que se suelen usar con ese fin son las de lisina y cisteína. Gygi y colaboradores³⁹⁰ desarrollaron la aproximación ICAT (isotope-coded affinity tag), en la cual los residuos de cisteína se hacen reaccionar con un reactivo que contiene de cero hasta ocho átomos de deuterio y además, lleva unido un grupo de biotina para la posterior purificación de los péptidos mediante cromatografía de afinidad³⁷⁹. Un aspecto crítico del reactivo ICAT es que la sustitución de ^1H por ^2D cambia el tiempo de retención de las especies marcadas en RP-HPLC^{391,392}, además, debido al carácter hidrofóbico de la molécula de biotina, los péptidos eluyen en un intervalo de tiempo muy estrecho. Para solventar estos inconvenientes el reactivo ICAT se ha modificado por un reactivo llamado “cleavable” ICAT (cICAT)³⁹³. Este reactivo sustituye el ^1H o ^2D por el ^{12}C y ^{13}C con el objeto de obtener una diferencia de masa significativa entre los péptidos marcados y eliminar los efectos cromatográficos de marcaje con 2D. Además, la molécula de biotina de cICAT se puede eliminar después de la purificación por afinidad reduciendo así la hidrofobicidad de los péptidos marcados, los cuales ahora eluyen en un intervalo de

tiempo más amplio. El elevado coste de los reactivos³⁸⁵ es otro de los inconvenientes de ICAT.

La estrategia ICPL (isotope-coded protein label) fue introducida por Schmidt y colaboradores en 2005 y usa $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}_6$ -ácido nicotínico-succinimida como marcador ICPL³⁹⁴. Esta estrategia permite el marcaje de las aminas primarias en el extremo N-terminal y los residuos de lisina. El marcaje se realiza a nivel de proteínas, antes de la digestión proteolítica, obteniendo una diferencia de masa de 6.0204 Da³⁸⁵. Las principales desventajas de esta técnica³⁸⁵ se atribuyen a la influencia del marcaje ICPL en el punto isoeléctrico de las proteínas y al hecho de solo poder comparar dos muestras simultáneamente.

La mayoría de las técnicas de proteómica cuantitativa permiten únicamente la comparación de solo dos muestras, mientras que iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) y TMT (Tandem Mass Tags) permiten el análisis de más de dos muestras (de cuatro e incluso hasta ocho muestras). A continuación se va a describir la técnica de marcado con iTRAQ, puesto que es la que ha sido utilizada en la presente tesis, pero TMT es el mismo concepto que iTRAQ pero distinta marca comercial.

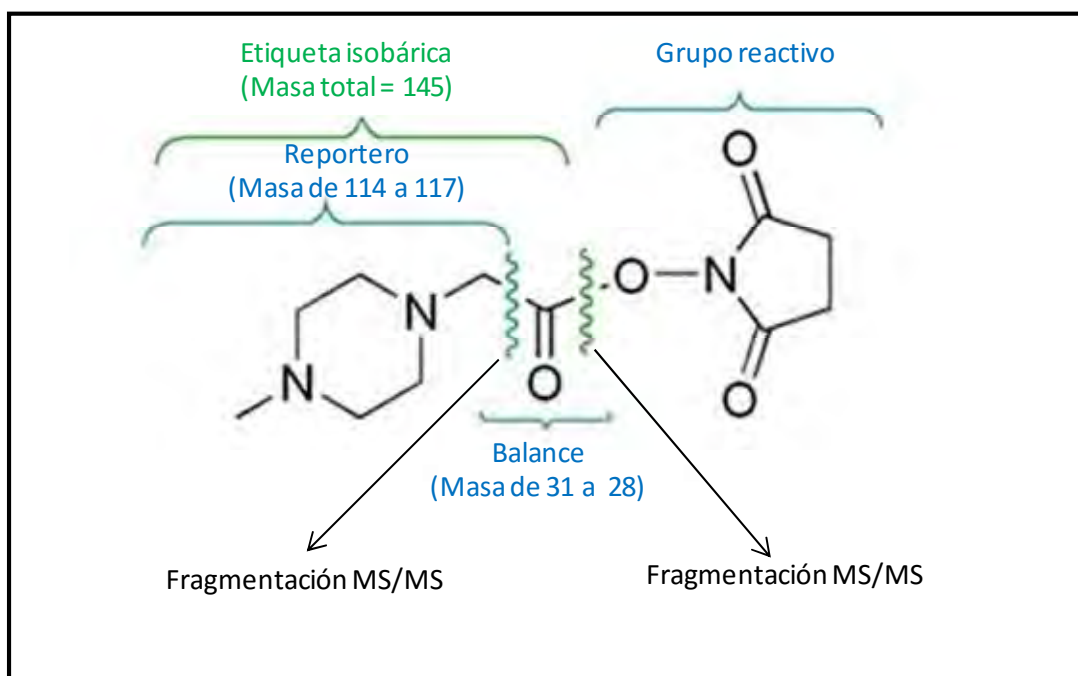


Figura 12. Estructura del reactivo iTRAQ

Las etiquetas iTRAQ se unen a los péptidos a través de un grupo N-hidroxisuccimida que es capaz de reaccionar con el grupo amino N-terminal de los

péptidos y el grupo amino de la cadena lateral de las lisinas (Ver Figura 12), además las etiquetas constan de un reportero de masa variable, que identifica cada una de las muestras a analizar sin alterarla carga ni la eficiencia de ionización del péptido, y un “balance” para que la masa total sea igual a 145 Da en todos los marcajes. Además, iTRAQ permite la cuantificación múltiple de hasta 8 muestras distintas gracias a los iones reporteros resultantes tras la fragmentación en el intervalo m/z de 113 hasta 121.

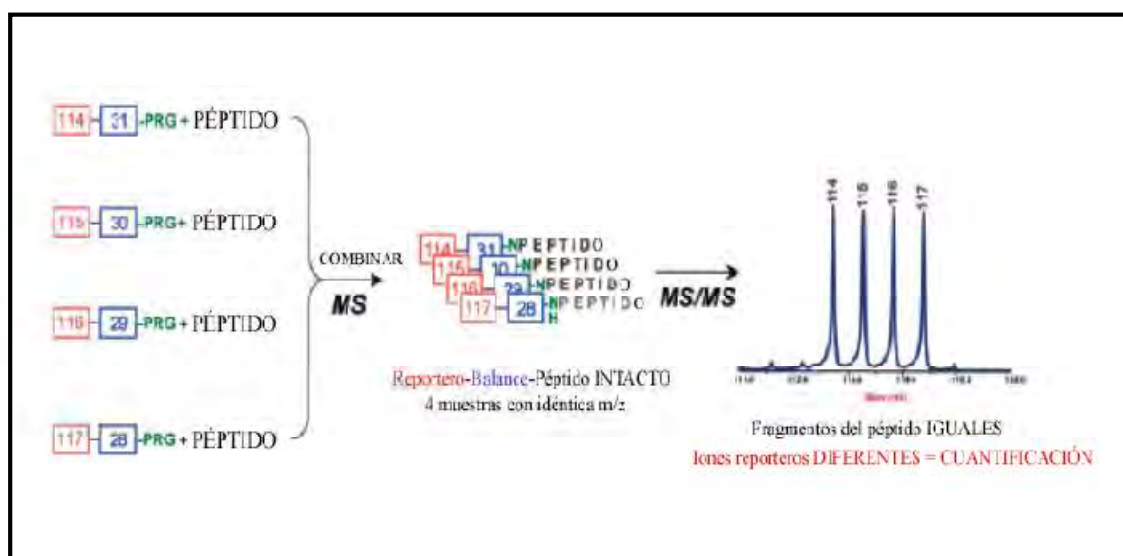


Figura 13. Esquema simplificado de un ensayo iTRAQ

El proceso de marcaje de las muestras tiene lugar tras la digestión enzimática a nivel de péptidos. Una vez se marcan los péptidos con los distintos reporteros, se combinan y analizan mediante una espectrometría de masas en tándem. Debido a la naturaleza isobárica de los reactivos, el mismo péptido de cada muestra aparece como un único pico en el espectro de masas, reduciendo así la complejidad del espectro de masas. Bajo colisión inducida por disociación, los péptidos marcados con el reactivo iTRAQ liberan los iones reporteros (114, 115, 116, 117) entre otros fragmentos. El área de pico de los iones reporteros proporciona una cuantificación relativa de los péptidos y además el espectro de fragmentación proporciona información de la secuencia del péptido, lo que permitirá identificar la proteína de la que provienen³⁸⁵.

La capacidad de iTRAQ de comparar varias muestras y su elevada cobertura de secuencia debido al marcaje específico en el grupo amina y la mejora de los espectros

de MS y MS/MS debido al marcaje iTRAQ son las principales ventajas de esta técnica. No obstante, no se puede obtener información a nivel de proteínas y es difícil de detectar modificaciones post-traduccionales y degradaciones proteicas. Esta técnica es difícil de implementar en trampas iónicas, debido a que los grupos reporteros se encuentran en la zona de baja masas: 114 a 117 Da³⁸⁵.

Los ácidos carboxílicos de las cadenas laterales de ácido glutámico y aspártico así como el C-terminal de las cadenas polipeptídicas pueden ser isotópicamente marcados mediante esterificación utilizando alcoholes deuterados^{395,396}.

Las propiedades químicas de los aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas y de los péptidos son bastante similares. Como consecuencia de ello, casi todos los métodos de marcaje químico podrían ser aplicados a proteínas intactas. Por ejemplo, el reactivo ICPL³⁹⁴ ha sido empleado para el marcaje del extremo N-terminal de los péptidos así como para el marcaje de las cadenas laterales de lisina en proteínas intactas. Un protocolo similar ha sido descrito para iTRAQ³⁹⁷. En la mayoría de los casos, la desnaturalización completa de las proteínas mejora los resultados del marcaje pero hay que tener cuidado porque se podría producir procesos de precipitación de proteínas (por ejemplo por el uso de reactivos marcados)³⁷⁹. El marcaje de las proteínas intactas puede resultar bastante ventajoso debido a que la separación de las proteínas se puede realizar con las muestras ya combinadas pero hay que tener en cuenta que la tripsina no es capaz de catalizar la ruptura de los residuos de las lisinas modificadas, lo que conlleva a la obtención de péptidos más largos que generalmente son más difíciles de identificar mediante MS³⁷⁹.

Una desventaja general de todas las estrategias de marcaje químico es que se pueden producir reacciones laterales que pueden producir productos inesperados afectando de manera adversa a los resultados de la cuantificación³⁷⁹.

Cuantificación absoluta usando patrones internos

Los isótopos sintéticos como marcadores se han empleado durante mucho tiempo en la espectrometría de masas, pero en la actualidad se están aplicando bastante bajo el nombre de AQUA (Absolute quantification of proteins)³⁹⁸. La cuantificación absoluta se puede conseguir por la adición de una cantidad conocida del péptido marcado isotópicamente al digerido proteico y la subsiguiente comparación de

la señal entre el péptido sintético y el endógeno de la muestra. A diferencia del marcaje metabólico, donde la información acerca de la cuantificación relativa se adquiere mediante un número elevado de proteínas en la mezcla, en el caso de la adición de péptidos sintéticos la cuantificación se centra en una o en unas pocas proteínas de interés. Esta aproximación es bastante atractiva para estudios centrados en el análisis y la validación de posibles biomarcadores en muestras clínicas³⁹⁹ o en la medida de las modificaciones que sufre un péptido, como por ejemplo ubiquitinación⁴⁰⁰.

Métodos sin marcaje

Actualmente se emplean dos estrategias distintas que no utilizan ningún tipo de marcaje³⁷⁹:

- La primera mide y compara la intensidad de la señal del péptido precursor perteneciente a una proteína.
- La segunda cuenta y compara el número de espectros de fragmentación obtenidos de los péptidos de una proteína.

Las estrategias de cuantificación sin marcaje, son las técnicas menos precisas y exactas debido a que las variaciones tanto sistemáticas como no-sistemáticas, cuando se considera todo el procedimiento experimental, se refleja en los datos obtenidos (Figura 11)³⁷⁹. A consecuencia de ello, el número de etapas en el proceso de tratamiento de muestra se debe reducir al mínimo e intentar controlar la reproducibilidad en cada etapa. Aun así, una de las ventajas de este tipo de estrategia es que no existe la necesidad de introducir ningún reactivo marcado en las proteínas o en los péptidos pudiendo evitar esa etapa y los costes de estos reactivos marcados, que en general son elevados. Además, desde el punto de vista analítico, presenta una serie de aspectos positivos³⁷⁹:

- No hay límite en los números de experimentos que se pueden comparar.
- Al contrario que en las estrategias que requieren un marcaje con isótopos, la complejidad del espectro (en términos de péptidos detectados en un cierto intervalo de tiempo) no aumenta.
- Los métodos sin marcaje poseen un intervalo dinámico más elevado que los métodos con marcaje.

Parte experimental

1.SE-METIL-SELENOCISTEÍNA COMO AGENTE PROTECTOR DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Hay un creciente interés en los efectos de los compuestos de la dieta contra el estrés oxidativo y los diferentes mecanismos de defensa implicados. El Selenio se requiere para la respuesta del sistema antioxidante como cofactor de la enzima GPx, la deficiencia de este elemento induce patologías asociadas con el estrés oxidativo. Se ha comprobado que el selenito protege a las células endoteliales del daño oxidativo provocado por un potente oxidante.

Se ha demostrado que los compuestos de Selenio son efectivos frente a varios tipos de tumores. Estos efectos protectores del Selenio parece ser que están relacionados con la presencia del Selenio como cofactor de las enzimas glutathion peroxidasa (GPx) y tiorredoxina reductasa, las cuales protegen a la célula del daño oxidativo.

En este trabajo se evaluó el efecto protector de diferentes concentraciones del compuesto Selenio Metil-Selenocisteína (SeMeSeCys) frente a un estrés oxidativo provocado por el compuesto tert-Butil hidroperóxido. Se llevó a cabo en la línea celular de hepatoma humano Hep G2. Esta línea celular es ampliamente utilizada en estudios “in vitro” puesto que, aun estando en cultivo, retiene su morfología y muchas de sus funciones. Con este estudio se demostró que SeMeSeCys, uno de los compuestos de Selenio más común en la dieta, tiene la capacidad de proteger las células Hep G2 de un daño oxidativo modulando la concentración de glutathion reducido, la producción de MDA y la actividad de enzimas antioxidantes.

En el presente trabajo se trataron las células Hep G2 (durante 2 y 20 h) con diferentes concentraciones de SeMeSeCys (0,01-10 μ M) y posteriormente se las sometió a un estrés tratándolas 3 horas con *t*-BOOH en una concentración de 200 μ M. Posteriormente se midieron se evaluaron en la células los parámetros que a continuación se indican para evaluar el efecto que ejerce la SeMeSeCys en la respuesta del sistema antioxidante frente al estrés provocado por *t*-BOOH:

- LDH (Lactato deshidrogenasa): Para medir el daño celular producido en la célula.
- GSH: Medida del glutathion reducido
- ROS: Medida de la generación de especies reactivas de oxígeno
- GR: Medida de la actividad de la glutathion reductasa
- GPx: Medida de la actividad de la glutathion peroxidasa
- MDA: Determinación de los niveles de malondialdehído como biomarcador de la peroxidación lipídica.

Además se realizaron estudios de especiación, para comprobar si se producía biotransformación de la SeMeSeCys en otras especies de Selenio dentro de la célula, mediante la técnica de HPLC acoplado a ICP-MS (Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas mediante plasma acoplado inductivamente).

**Se-METIL-SELENOCISTEÍNA PROTEGE A LAS CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HEPG2
CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR *tert*-BUTIL HIDROPERÓXIDO**

S. Cuello, S. Ramos, R. Mateos, M. Angeles Martín, Y. Madrid, C. Cámara, L. Bravo, L. Goya.

“Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide”

Anal. Bioanal. Chem., 2007, 389, 2167-2178

Este trabajo fue presentado como comunicación oral en:

“Congreso XXIX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular”, Elche, España, Septiembre, 2006.

“SPQ Analítica 2007”, Lisboa, Portugal, Marzo, 2007.

Este trabajo fue presentado como poster en:

“2007 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”, Taormina, Italia, Febrero, 2007.

Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide

Susana Cuello · Sonia Ramos · Raquel Mateos ·
 M. Angeles Martín · Yolanda Madrid ·
 Carmen Cámara · Laura Bravo · Luis Goya

Received: 15 June 2007 / Revised: 11 September 2007 / Accepted: 12 September 2007 / Published online: 19 October 2007
 © Springer-Verlag 2007

Abstract Selenium methylselenocysteine (Se-MeSeCys) is a common selenocompound in the diet with a tested chemopreventive effect. This study investigated the potential protective effect of Se-MeSeCys against a chemical oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH) on human hepatoma HepG2 cells. Speciation of selenium derivatives by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry depicts Se-MeSeCys as the only selenocompound in the cell culture. Cell viability (lactate dehydrogenase) and markers of oxidative status—concentration of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), generation of reactive oxygen species (ROS) and activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR)—were evaluated. Pretreatment of cells with Se-MeSeCys for 20 h completely prevented the enhanced cell damage, MDA concentration and GR and GPx activity and the decreased GSH induced by t-BOOH but did not prevent increased ROS generation. The results show that treatment of HepG2 cells with concentrations of Se-MeSeCys in the nanomolar to micromolar range confers a significant protection against an oxidative insult.

Keywords Antioxidant defences · Biomarkers for oxidative stress · Dietary antioxidants · Selenium compounds

Introduction

Human exposure to potentially toxic chemicals, either through an occupational environment, or as the result of plant and foodstuff pyrolysis (e.g. tobacco smoke, charbroiled foods) is almost unavoidable. In many instances, increased exposure to these hazardous chemicals, many of which are prooxidants or procarcinogens, is linked to an increased incidence of cardiovascular disease and cancer [1, 2]. This has prompted a search for diets or chemical supplements that might mitigate or prevent the toxic outcome of exposure. There is substantial evidence that antioxidative food components have a protective role against oxidative stress-induced atherosclerosis, degenerative and age-related diseases, cancer and aging [3, 4]. Among dietary compounds considered for chemopreventive activity, selenium showed early and continued promise [1, 2, 4–8]. Selenium is a trace element essential to human health found in fish, meat and plants such as garlic, onion and broccoli, and a deficiency of this element induces pathological conditions, such as cancer, coronary heart disease and liver necrosis [6, 9]. Garlic is the most popular and well-researched *Allium* plant that is known to accumulate selenium as selenoamino acid derivatives, including selenium methyl-l-selenocysteine (Se-MeSeCys), one of the major forms of selenium in the diet, and glutaryl-methylselenocysteine [9, 10].

Selenium compounds have been widely reported to be effective chemopreventive agents against multiple models of tumorigenesis [4–8, 11–14]. These protective effects of selenium seem to be primarily associated with its presence as a cofactor in the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase, which are known to protect cellular components from oxidative damage [1, 2]. Although these properties indicate that Se-MeSeCys may favourably affect the antioxidant defence system [1, 2], little is known about the

S. Cuello · Y. Madrid · C. Cámara
 Departamento de Química Analítica,
 Facultad de Químicas, Universidad Complutense,
 28040 Madrid, Spain

S. Ramos · R. Mateos · M. A. Martín · L. Bravo · L. Goya (✉)
 Departamento de Metabolismo y Nutrición,
 Instituto del Frio (CSIC),
 José Antonio Novais 10,
 28040 Madrid, Spain
 e-mail: luisgoya@ifc.csic.es

potentially beneficial role of Se-MeSeCys against oxidative damage in vivo, both in cultured cells and in live animals.

Human hepatocarcinoma HepG2 is widely used for biochemical and nutritional studies as a cell culture model of human hepatocytes since they retain their morphology and most of their function in culture [15]. In addition, HepG2 is a reliable model where many dietary antioxidants and conditions can be assayed with minor interassay variations [16–20]. Previous studies from our laboratory have shown that the plant flavonol quercetin [18], the olive oil phenol hydroxytyrosol [19] and a digested coffee melanoidin [20] elicit a favourable response of the antioxidant defence system in cultured human hepatoma HepG2 cells. Therefore, the potential protective effect of different concentrations of the dietary compound Se-MeSeCys against an oxidative stress chemically induced by a potent prooxidant, *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH), has now been tested in cultures of HepG2. Cell integrity and several markers of oxidative status, such as concentration of reduced glutathione (GSH), generation of reactive oxygen species (ROS), evaluation of the activity of the antioxidant enzymes GPx and glutathione reductase (GR) and determination of malondialdehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation, were measured to estimate the effect of Se-MeSeCys in cell survival and the response of the antioxidant system of HepG2 to t-BOOH.

Materials and methods

Reagents and samples

Se-MeSeCys (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) was dissolved in Milli-Q water. Inorganic selenium solution was obtained by dissolving sodium selenite (Merck, Darmstadt, Germany) in deionized Milli-Q water. Stock solutions of 10 mg/L were stored in the dark at 4 °C and working standard solutions were prepared daily by dilution. For hydride generation atomic fluorescence spectroscopy (AFS) studies, sodium borohydride (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was prepared in 0.3% sodium hydroxide. For high-performance liquid chromatography (HPLC)–inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) studies, heptafluorobutyric acid, trifluoroacetic acid and ammonium citrate from Sigma (St. Louis, MO, USA) and methanol (Sharlab, Barcelona, Spain) were used in the different chromatographic mobile phases. For the enzymatic extraction procedure the nonspecific protease XIV (Sigma) was used to prepare the extracts. H₂O₂ and HNO₃ were used for acid digestion of samples. The Bradford reagent was from Bio-Rad Laboratories. All other chemicals, including GR, GSH and oxidized glutathione, NADPH, *o*-phthalaldehyde (OPT), dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from

Sigma Chemical Co. Other reagents were of analytical or chromatographic quality.

Instrumentation

For total selenium determination, samples were microwave-assisted acid-digested in doubled-walled advanced composite vessels using a 1,000-W microwave sample preparation system microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA). A Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandelin, Germany) equipped with a titanium 3-mm-diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 2,200 W at a frequency of 20 kHz was used for the extraction of selenium species. An HP-4500 plus inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), fitted with a Babington nebulizer and a Scott double-pass spray chamber cooled by a Peltier system was used for total selenium determination after chromatographic separation. A PU-2089 HPLC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) with a 100-μL injection loop was used for the chromatographic experiments. Anion-exchange chromatography was performed using a Hamilton PRP-X100 (Reno, NE, USA) column (10-μm particle size, 250 mm×4.1-mm inner diameter). Reversed-phase chromatography was performed using a C-18 Gemini column (10-μm particle size, 150 mm×2.0-mm inner diameter; Phenomenex, Torrance, CA, USA). For molecular weight fractionation, 10-kDa cut-off filters (Millipore, Bedford, MA, USA) and an Eppendorf (Hamburg, Germany) 5804 F34-6-38 centrifuge were used [21].

Cell culture

Human hepatoma HepG2 cells were maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. They were grown in DMEM-F12 medium from Biowhitaker (Innogenetics, Madrid, Spain), supplemented with 2.5% Biowhitaker foetal bovine serum (FBS) and 50 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin (all from Sigma, Madrid, Spain). Plates were changed to FBS-free medium before the beginning of the assay. The serum added to the medium favours growth of most cell lines but might interfere in the running of the assays and affect the results. Moreover, fairly good growth of HepG2 cells in FBS-free DMEM-F12 has been observed [17].

Cell treatment

Two sets of experiments were designed for this study: (1) experiments of plain treatment of cells with Se-MeSeCys for 2 or 20 h to test for a direct effect of the selenocompound and (2) experiments of pretreatment of cells with Se-MeSeCys for 2 or 20 h before submitting the cells to an

oxidative stress by t-BOOH to test for a protective effect against an oxidative insult. In order to infer the effect of the time of treatment on the different concentrations of Se-MeSeCys, two experimental parameters of short (2-h) and long (20-h) treatment with the compound were selected in accordance with previous studies [17, 18]. Lactate dehydrogenase (LDH), GSH, MDA and ROS were evaluated in both experimental conditions and, in addition, GPx and GR were also determined in experiment 2. The different concentrations of Se-MeSeCys were dissolved in serum-free culture medium. For further details see [18–20].

Procedure for selenium determination and speciation

Cultured cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), collected by scraping and resuspended in PBS. A 1-mL aliquot of cell sample was digested in an analytical microwave oven with 1 mL of nitric acid and 0.5 mL of hydrogen peroxide following cycles of 5 min pressure/15 min break. Se(VI) was reduced to Se(IV) after the acid digestion. Hydrochloric acid (6 M final concentration) and heating at 95 °C for 1 h are needed to convert Se(VI) to Se(IV). The solutions were then diluted to 10 mL with Milli-Q water. Total selenium concentration was determined by the continuous selenium hydride system connected to the AFS equipment. Hydrochloric acid (3 M) and 1% sodium tetrahydroborate (w/v) were used to generate the selenium hydride. For selenium speciation, 1 mL of cell or culture medium samples, 2 mL of Milli-Q water and 10 mg of the nonspecific protease *Streptomyces griseus* (protease XIV) were placed in a 10-mL Teflon vial. The mixture was sonicated for 120 s at 20 W of power intensity. In order to enhance sample cleanup after enzymatic hydrolysis, samples were centrifuged and the supernatants were removed and passed through a 10-kDa cut-off filter (centrifugation at 7,500 g and 20 °C). Liquid chromatography (LC) coupled with ICP-MS was used for the measurement of selenium species with the operating conditions given in Table 1.

Evaluation of LDH, GSH and MDA

Cells were plated in 60-mm diameter plates at a concentration of 1.5×10^6 per plate and the assay was carried out 2 days later. Cells were treated as described in the previous section and LDH leakage to the culture medium was estimated from the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content [16, 18]. The content of GSH was quantitated by the fluorometric assay of Hissin and Hilf [22]. The method takes advantage of the reaction of GSH with OPT at pH 8.0. Fluorescence was measured at an emission wavelength of 460 nm, with an excitation wavelength of 340 nm. The precise protocol has been described elsewhere [16, 18]. Cellular MDA was analysed by HPLC as its DNPH derivative [23]. Cells were

Table 1 Instrumental operating conditions for selenium determination by high performance liquid chromatography (HPLC) inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

Operating parameters and conditions		
HPLC parameters		
Analytical column	PRP-X100	Phenomenex C-18
Eluent	10mM citrate buffer, H ₂ O–MeOH (98:2)	0.1% heptafluorobutyric acid; 0.05% trifluoroacetic acid; 2% MeOH
Eluent flow rate	1 mL/min	0.2 mL/min
Elution programme	Isocratic	Isocratic
Injection volume	100 µL	20 µL
ICP-MS conditions		
Forward power	1,350 W	
Plasma gas (Ar) flow rate	15 L/min	
Auxiliary gas (Ar) flow rate	1.3 L/min	
Carrier gas (Ar) flow rate	1.4 L/min	
Nebulizer type	Babington	
Isotopes monitored	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se	

treated as in the LDH assay and then collected. For MDA, values are expressed as nanomoles of MDA per milligram of protein; protein was measured by the Bradford kit.

Determination of ROS

Cellular ROS were quantified by the DCFH assay using a microplate reader [24]. After being oxidized by intracellular oxidants, DCFH will become dichlorofluorescein (DCF) and this will fluoresce. By quantifying the fluorescence over a period of 90 min, we obtained a fair estimation of the overall oxygen species generated under the different conditions. This parameter gives a very good evaluation of the degree of cellular oxidative stress. The assay has been described elsewhere [16, 18].

Determination of GPx and GR Activity

For the assay of the GPx and GR activity, cells previously treated as in the LDH, GSH and MDA assays were suspended in PBS and centrifuged at low speed for 5 min. Cell pellets were resuspended in 20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, 5 mM EDTA and 0.5 mM mercaptoethanol, sonicated, and centrifuged at 3,000 g for 15 min. The enzyme activity was measured in the supernatants. The determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using t-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of the

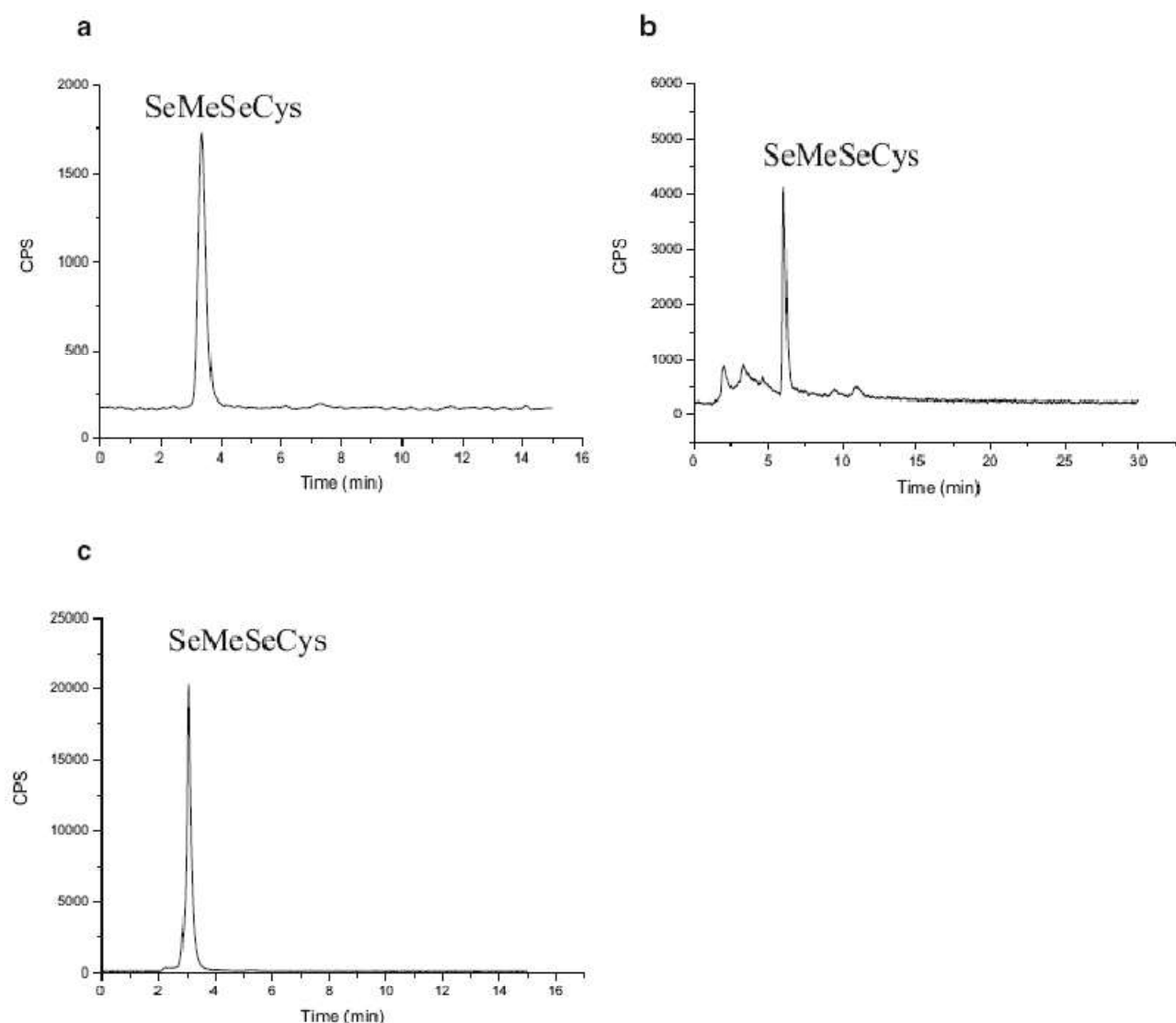


Fig. 1 Chromatogram of selenium species by a anion-exchange chromatography in cell homogenates, b reversed-phase chromatography in cell homogenates and c anion-exchange chromatography in collected media from cell cultures

reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) by GR [25]. GR activity was determined by following the decrease in absorbance owing to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione [26]. The methods have been previously described [16, 18]. Protein was measured by the Bradford kit.

Statistics

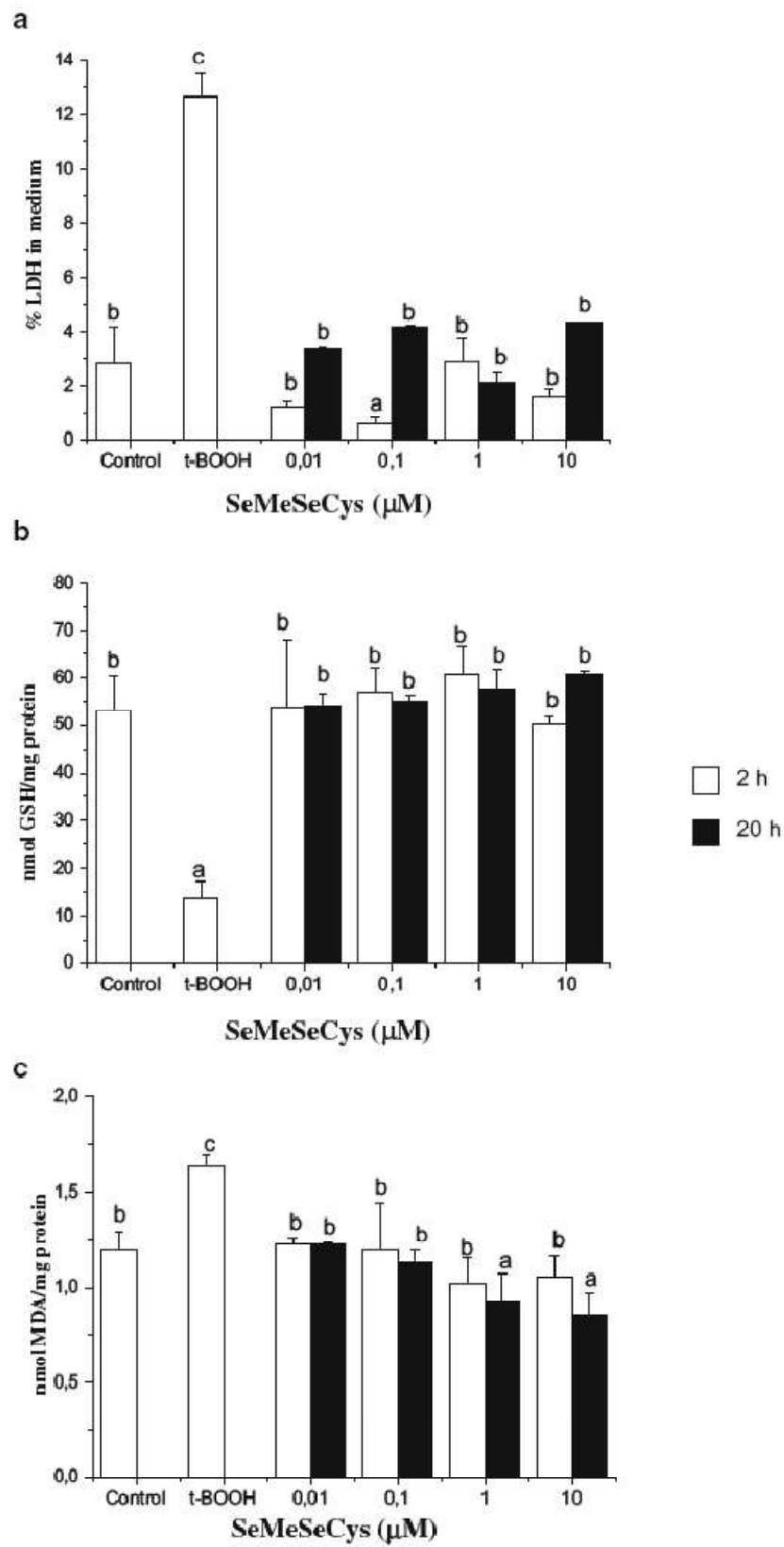
Statistical analysis of data was as follows. Prior to analysis the data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way analysis of variance was followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by a Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$. SPSS version 12.0 was used.

Results and discussion

Total selenium content and speciation

Analytical systems developed for the speciation of selenium species employ a powerful liquid chromatograph coupled to a specific detector with a high-efficiency sample introduction system. Nowadays, the most favoured instrument combination

Fig. 2 Experiment 1. Effect of Se-MeSeCys on cell viability and intracellular concentration of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). Cells treated with 200 μ M *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) for 3 h are positive controls. a Lactate dehydrogenase (LDH) values are means \pm the standard deviation (SD) of six to eight data. b GSH values are means of four or five different samples per condition. c MDA values are means \pm SD, $n=4$. Groups of data within the same graphic with a different letter are statistically different ($P < 0.05$)



for this purpose is ICP-MS coupled with various LC techniques, such as anion-exchange, cation-exchange, reversed-phase, ion-pair, size-exclusion and chiral chromatography. Identification of species is achieved by retention time matching with available standards utilized in a standard addition mode [21, 27, 28]. This analysis has not been previously applied to cell culture studies.

Speciation of selenium was carried out in order to observe potential biotransformation of Se-MeSeCys. For separation and unambiguous identification of selenium species two chromatographic techniques (reversed-phase chromatography and anion-exchange chromatography) coupled with ICP-MS were used. The addition of a standard to the sample was necessary to confirm the species that appear in chromatograms. Duplicates of samples were spiked with 5 µg/L (cell samples) or 30 µg/L (culture medium samples) of Se-MeSeCys at the end of the sample treatment. The single peak that appears in chromatograms of cell homogenates and collected medium indicates that Se-MeSeCys is the only relevant selenium species (98% of the total selenium content) in cultures of HepG2 treated with this selenium derivative, suggesting no biotransformation of the compound during the course of the assay (Fig. 1). Preservation of the original structure of Se-MeSeCys indicates that the protective effect should be bestowed to the whole molecule. Although the presence of the SH group in the cysteine moiety could greatly help to increase the antioxidant potential and, thus, the protective effect against an oxidative insult, the SH group by itself does not necessarily confer antioxidant capacity nor protection against oxidative stress to a molecule since this SH group and its constituent amino acids are widely present in all proteins and most biological peptides and none has shown a protective effect against oxidative damage. This fact suggests that the reducing group (SH) must be in the proper template or adequate biological presentation to exert the antioxidant protective effect. Further experimentation focussed separately on pure selenium and cysteine will be necessary to delineate the effect of the different moieties.

In order to predict the potential bioavailability and metabolism of selenium and its species from selenium-enriched radish, Pedrero et al. [29] performed an *in vitro* gastrointestinal process, concluding that the concentration of the species found, selenomethionine and Se-MeSeCys, remains almost unaltered after simulated gastrointestinal digestion. Although other authors have found intense metabolism of Se-MeSeCys to methylseleninic acid in all tissues containing β -lyase enzyme activity [30], the absence of any structural transformation in the Se-MeSeCys molecule throughout the gastrointestinal tract ensures preservation of the complete biological activity in a strenuous metabolic environment. However, the present findings in cultured live cells should be considered as a first necessary step in research on the protective effects of selenium compounds

against oxidative stress, and future research including experiments in live animals should be delineated in order to address the *in vivo* metabolic fate of this compound.

Total selenium content was measured in cells treated for 24 h with Se-MeSeCys at two different concentrations (10 and 100 µM) to evaluate the uptake capability of selenium by HepG2 cells. The selenium concentration data were validated by applying the method to a certified reference material: bovine liver CRM 185R (1.68 ± 0.14 mg/kg). The result obtained, 1.8 ± 0.2 mg/kg, was in agreement with the reference value. The final concentration of Se-MeSeCys inside the cells remained relatively constant regardless of the selenium dose (13.2 ± 0.2 µg/mL homogenate in cells treated with 10 µM compared with 12.1 ± 1.1 µg/mL in those treated with 100 µM), probably owing to saturation of uptake mechanisms. In fact, in human trabecular meshwork (HTM) cells treated with methylselenic acid, saturation of selenium uptake was observed at the same doses [31]. No amount of any selenium compound was found in either the culture medium or cell homogenate in HepG2 untreated cultures.

Cell viability

As a trace element, selenium appears at low concentrations in the diet but chemopreventive (antioxidant and antitumorigenic) levels of selenium appear to be at doses greater than those regarded as necessary for supporting adequate expression of selenoenzymes [32, 33]. Selenium requirements in human diet are in a very narrow range; consumption of food containing less than 0.1 mg/kg of this element will result in its deficiency, whereas dietary levels above 1 mg/kg will lead to toxic manifestations [34, 35]. Although selenite has been reported to protect human endothelial cells from oxidative damage induced by a potent prooxidant [36], it has been suggested that the cancer chemopreventive effect of Se-MeSeCys in tumour cells may reflect prooxidant rather than antioxidant activity of this compound [14]. Therefore, before determining the protective effect of the antioxidant tested, it is necessary to ensure that no direct damage is caused to the cell by the compound. Thus, in experiment 1, cell toxicity and basal cellular redox status were determined in cells treated for short (2-h) and long (20-h) periods with different concentrations of Se-MeSeCys in the nanomolar to micromolar range. The concentration range is fairly realistic in order to evaluate the effect at the physiological level since steady-state concentrations around 0.7 µM of all selenium species have been reported in human serum [37]. Our results show that treatment with concentrations of Se-MeSeCys up to 10 µM for 20 h evoked no toxicity in HepG2 (Fig. 2a). Indeed, the complete inhibition of cell damage in experiment 2 when human hepatoma HepG2 cells were pretreated with Se-MeSeCys for 2 or 20 h prior to being subjected to

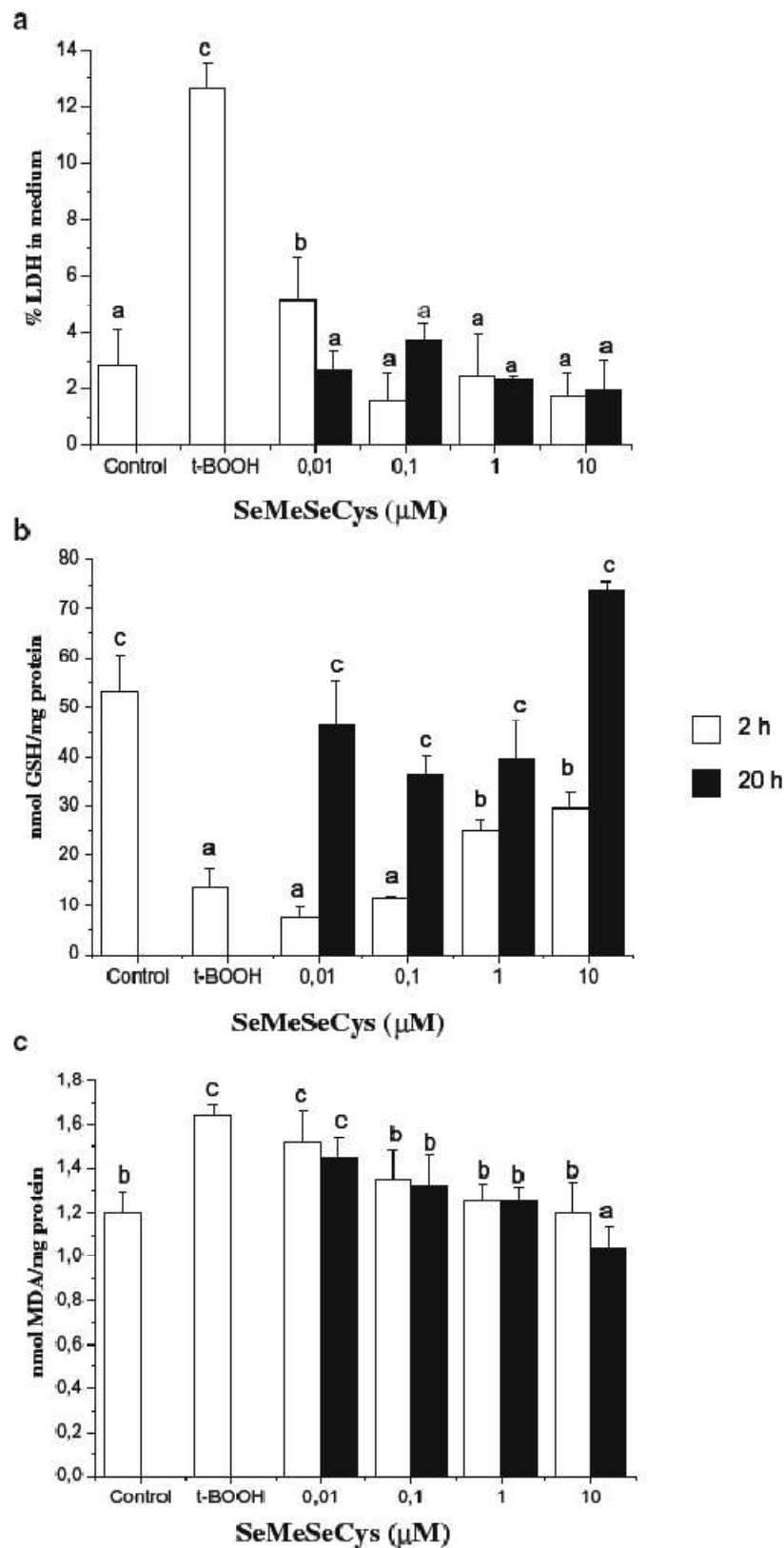


Fig. 3 Experiment 2. Protective effect of Se-MeSeCys on cell viability and intracellular concentration of GSH and MDA. **a** LDH values are means \pm SD of six to eight data. **b** GSH values are means of four or five different samples per condition. **c** MDA values are means \pm SD, $n=4$. Groups of data within the same graphic with a different letter are statistically different ($P<0,05$)

t-BOOH (Fig. 3a) indicates that integrity of the Se-MeSeCys-treated cells was largely protected against the oxidative insult.

GSH concentration

Cells are naturally provided with an extensive array of protective enzymatic and nonenzymatic antioxidants that counteract the potentially injurious oxidizing agents [2, 16–20, 32, 36]. But even this multifunctional protective system cannot completely prevent the deleterious effects of ROS, and consequently oxidatively damaged molecules accumulate in cells. GSH is the main nonenzymatic antioxidant defence within the cell and plays an important role in protection against oxidative stress, as a substrate in GPx-catalysed detoxification of organic peroxides, by reacting with free radicals and by repairing free-radical-induced damage through electron-transfer reactions [2, 16–20]. It is usually assumed that GSH depletion reflects intracellular oxidation. In contrast, an increase in GSH concentration

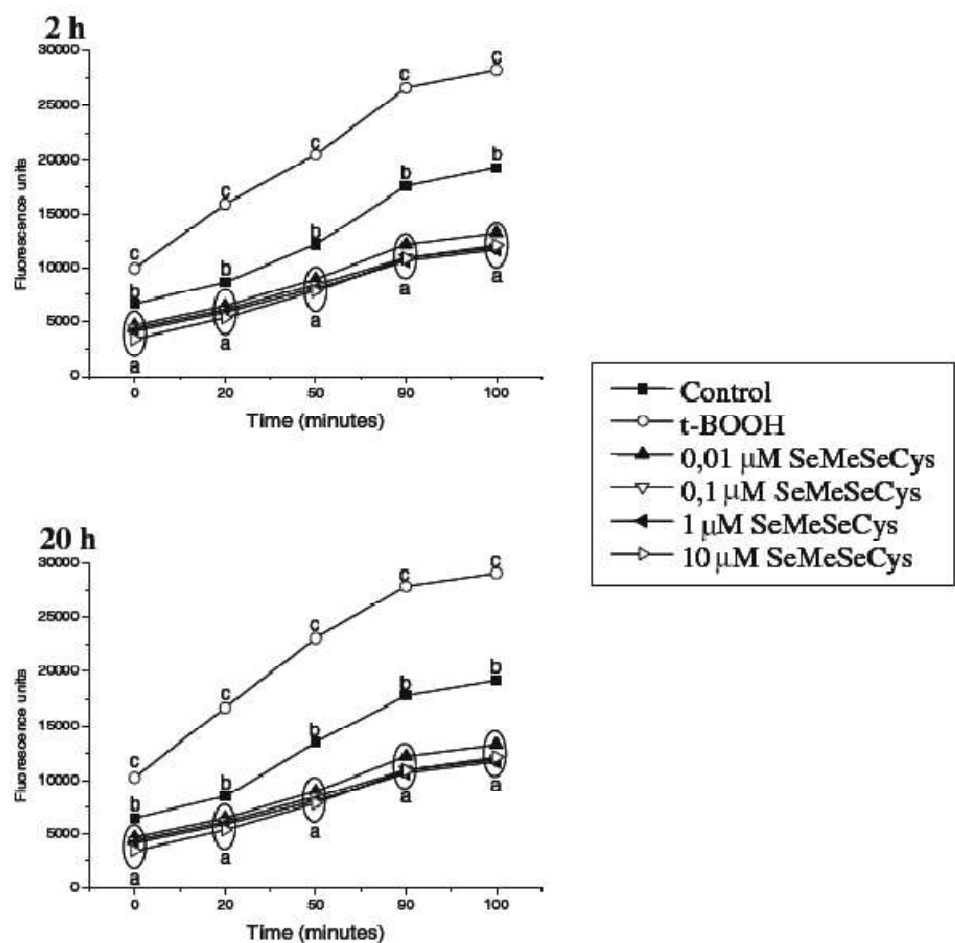
could be expected to prepare the cell against a potential oxidative insult [16–20, 38, 39].

In our experimental conditions, addition of Se-MeSeCys did not evoke changes in GSH concentration, whereas treatment of HepG2 cells with 200 μ M t-BOOH induced a remarkable decrease in the concentration of GSH indicative of oxidative stress (Fig. 2b). This decrease of GSH induced by t-BOOH was partly (2 h) or completely (20 h) prevented by pretreatment with Se-MeSeCys (Fig. 3b). This result could explain the protected cell integrity reported in the previous section since maintaining GSH concentration above a critical threshold while facing a stressful situation represents an advantage for cell survival.

MDA concentration

An important step in the degradation of cell membranes is the reaction of ROS with the double bonds of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) to yield lipid hydroperoxides. On breakdown of such hydroperoxides a great variety of aldehydes can be formed; MDA, a three-carbon compound

Fig. 4 Experiment 1. Effect of Se-MeSeCys on intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Cells treated with 200 μ M t-BOOH for 3 h are positive controls. Different letters associated with symbols indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) when that group or close groups of data are compared within the same time point. Values are means \pm SD of seven or eight different samples per condition. SD values were not included owing to intense bar overlapping



t-BOOH (Fig. 3a) indicates that integrity of the Se-MeSeCys-treated cells was largely protected against the oxidative insult.

GSH concentration

Cells are naturally provided with an extensive array of protective enzymatic and nonenzymatic antioxidants that counteract the potentially injurious oxidizing agents [2, 16–20, 32, 36]. But even this multifunctional protective system cannot completely prevent the deleterious effects of ROS, and consequently oxidatively damaged molecules accumulate in cells. GSH is the main nonenzymatic antioxidant defence within the cell and plays an important role in protection against oxidative stress, as a substrate in GPx-catalysed detoxification of organic peroxides, by reacting with free radicals and by repairing free-radical-induced damage through electron-transfer reactions [2, 16–20]. It is usually assumed that GSH depletion reflects intracellular oxidation. In contrast, an increase in GSH concentration

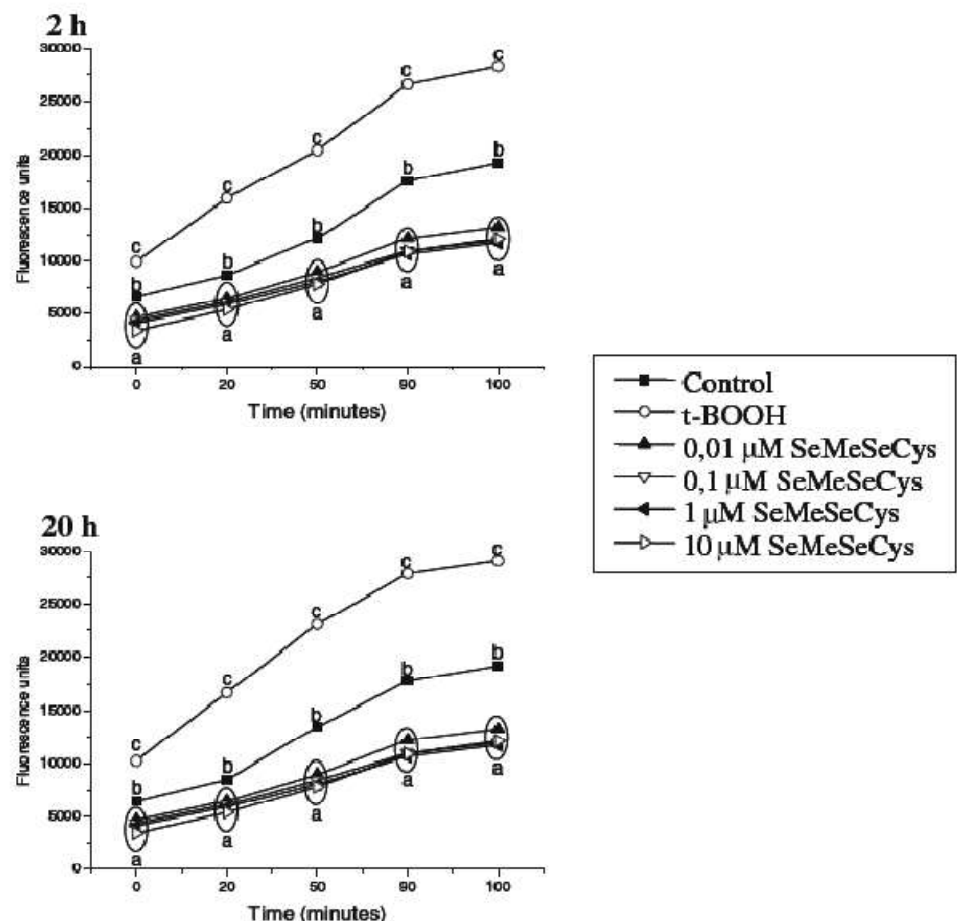
could be expected to prepare the cell against a potential oxidative insult [16–20, 38, 39].

In our experimental conditions, addition of Se-MeSeCys did not evoke changes in GSH concentration, whereas treatment of HepG2 cells with 200 μ M t-BOOH induced a remarkable decrease in the concentration of GSH indicative of oxidative stress (Fig. 2b). This decrease of GSH induced by t-BOOH was partly (2 h) or completely (20 h) prevented by pretreatment with Se-MeSeCys (Fig. 3b). This result could explain the protected cell integrity reported in the previous section since maintaining GSH concentration above a critical threshold while facing a stressful situation represents an advantage for cell survival.

MDA concentration

An important step in the degradation of cell membranes is the reaction of ROS with the double bonds of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) to yield lipid hydroperoxides. On breakdown of such hydroperoxides a great variety of aldehydes can be formed; MDA, a three-carbon compound

Fig. 4 Experiment 1. Effect of Se-MeSeCys on intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Cells treated with 200 μ M t-BOOH for 3 h are positive controls. Different letters associated with symbols indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) when that group or close groups of data are compared within the same time point. Values are means \pm SD of seven or eight different samples per condition. SD values were not included owing to intense bar overlapping



formed by scission of peroxidized PUFAs, mainly arachidonic acid, is one of the main products of lipid peroxidation [40]. Since MDA has been found at elevated levels in various diseases thought to be related to free-radical damage, it has been widely used as an index of lipoperoxidation in biological and medical sciences [41]. However, other than our previous results, reports of determination of MDA levels in cell culture conditions are extremely scant in the literature [42].

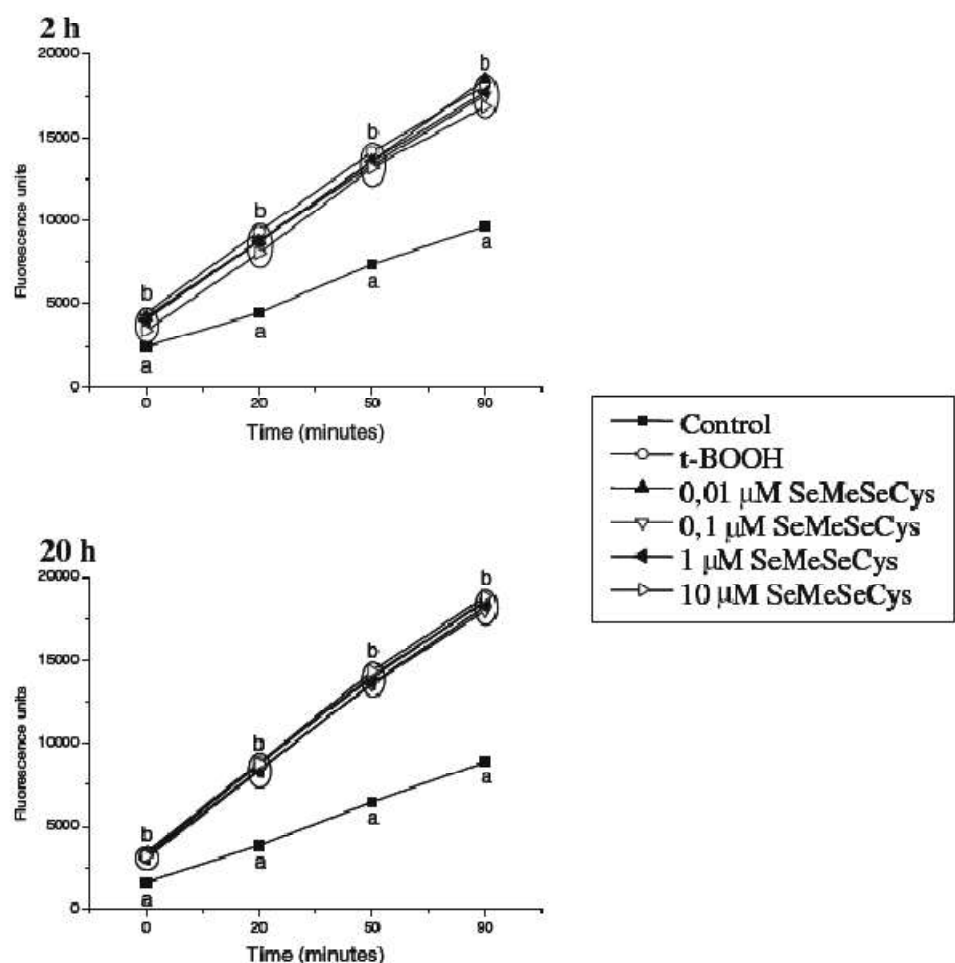
We have established a new method of evaluation of MDA in cultures of human hepatoma cells that is sensitive enough to detect a significant increase in MDA concentration in response to an oxidative stress induced by t-BOOH [23]. By using this method, we found that a 3-h treatment of HepG2 with 200 μ M t-BOOH evoked a significant increase of about 35% in the cellular concentration of MDA, indicating damage to cell lipids (Figs. 2c, 3c). In fact, a significant decrease of MDA was observed in cells treated with 1 or 10 μ M Se-MeSeCys for 20 h in experiment 1 (Fig. 2c). In addition, the t-BOOH-induced increase of MDA was

completely avoided when cells were pretreated for 2 or 20 h with 0.1–10 μ M Se-MeSeCys in experiment 2 (Fig. 3c). This protection by Se-MeSeCys against an induced lipid peroxidation in a cell culture has not been previously reported and is in line with previous studies that showed a similar effect by other dietary compounds, including plant polyphenols such as tea catechins [43, 44], quercetin [18], olive oil hydroxytyrosol [19], β -carotene or lutein [43], and Maillard reaction products such as coffee melanoidin [20] in the same cell line, human hepatoma HepG2.

ROS generation

Accumulation of ROS in several cellular components is thought to be a major cause of molecular injury leading to cell aging and to age-related degenerative diseases such as cancer, brain dysfunction and coronary heart disease [2, 3, 32, 36]. Direct evaluation of ROS yields a very good indication of the oxidative damage to living cells [24]. Based upon the fact that nonfluorescent DCFH crosses cell

Fig. 5 Experiment 2. Protective effect of Se-MeSeCys on intracellular ROS generation. Different letters associated with symbols indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) when that group or close groups of data are compared within the same time point. Values are means \pm SD of seven or eight different samples per condition. SD values were not included owing to intense bar overlapping



membranes and is oxidized by intracellular ROS to highly fluorescent DCF [45], the intracellular DCF fluorescence can be used as an index to quantify the overall oxidative stress in cells [16–20]. A prooxidant such as *t*-BOOH can directly oxidize DCFH to fluorescent DCF, and it can also decompose to peroxy radicals and generate lipid peroxides and ROS, thus increasing fluorescence.

A significant increase in ROS generation was observed in HepG2 cells treated with 200 μM *t*-BOOH for the 90 min of the assay, whereas ROS levels in cells treated with 0.01–10 μM Se-MeSeCys in experiment 1 were below those of control nonstressed cells (Fig. 4). Similar to what was observed with other competent antioxidants [18, 19],

the presence of Se-MeSeCys in the cell culture appears to reduce the progressive formation and accumulation of oxygen radicals by the mitochondrial respiratory chain [18, 19]. The increased ROS generation induced by *t*-BOOH was not prevented in cultured cells pretreated for 2 or 20 h with Se-MeSeCys in experiment 2 (Fig. 5), contrary to what was previously reported with quercetin [18], but similar to what was observed with other dietary antioxidants such as the olive oil phenol hydroxytyrosol [19] and coffee melanoidin [20]. In the 2-h pretreatment condition, this phenomenon is consistent with the partial recovery of the levels of GSH, which may be explained by an increased consumption of GSH in the enzymatic and nonenzymatic

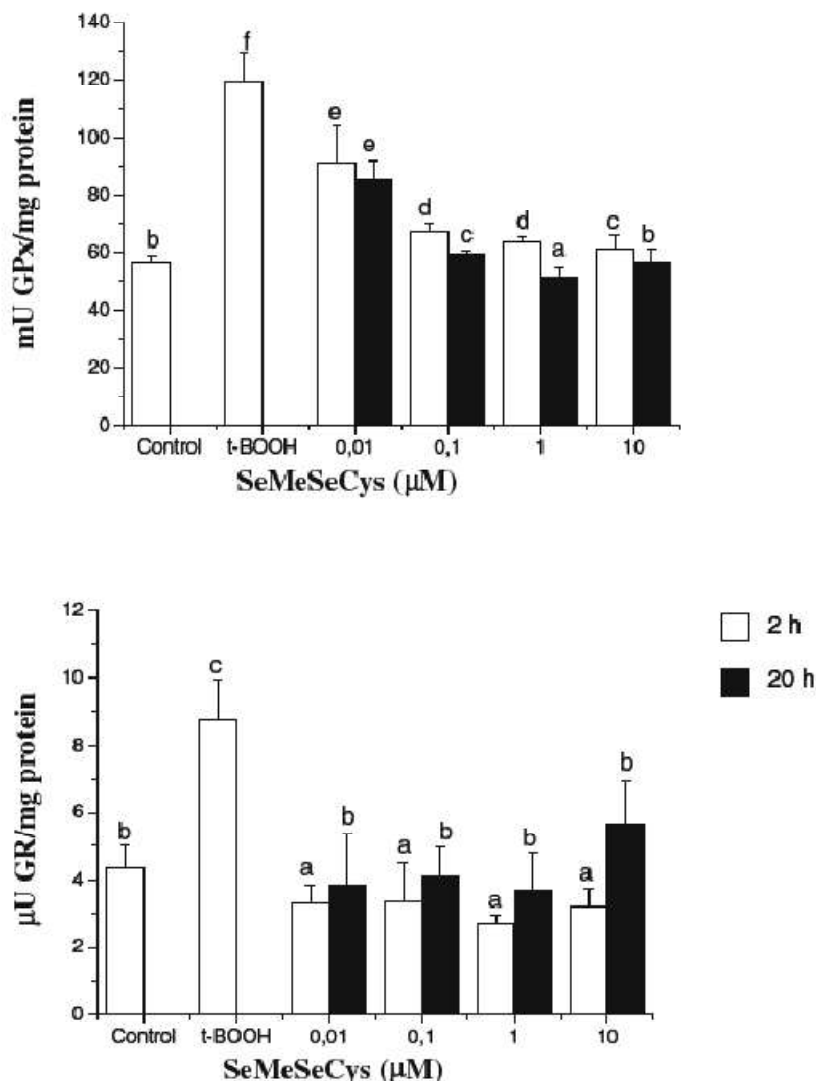


Fig. 6 Experiment 2. Protective effect of Se-MeSeCys on the activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Groups of data within the same graphic with a different letter are

statistically different ($P < 0.05$). Values are means \pm SD of four or five different samples per condition

quenching of ROS generated by t-BOOH. In any case, these data suggest that high levels of ROS generated during the stress period are more efficiently quenched in cells pretreated with Se-MeSeCys, resulting in reduced cell damage and lipid peroxidation.

GPx and GR activity

In the defence against oxidative stress, the cellular antioxidant enzyme system plays a crucial role and changes in the activity of antioxidant enzymes can be considered as biomarkers of the antioxidant response [16–20, 46, 47]. GPx catalyses GSH oxidation to oxidized glutathione at the expense of H_2O_2 or other peroxides [47] and GR recycles oxidized glutathione back to GSH [3, 26]; therefore, their activities are essential for the intracellular quenching of cell-damaging peroxide species and the effective recovery of the steady-state concentration of GSH.

The chemopreventive activity of selenium has been attributed to its effect on a variety of molecular targets and cellular processes, although it appears that these targets and processes may differ with the prooxidant or tumorigenic agent and the chemical nature of the selenium compound [1, 2, 6, 32, 36]. Nevertheless, linkage of the antioxidant and antitumorigenic activity with positive effects on “protective” enzymes remains a recurrent theme and a common feature of most of the implicated enzymes is their function in sequestering ROS and/or maintaining the cell and cellular components in their appropriate redox state [1, 2, 32, 33, 36]. Some protective enzymes such as GPx are selenoproteins and are likely to be impacted by selenium supplementation [1, 36]. The significant increase in the activity of GPx and GR observed after a 3-h treatment with 200 μM t-BOOH (Fig. 6) clearly indicates a positive response of the cell defence system to face an oxidative insult [16–20]. Other dietary antioxidants have been tested by other authors and significant changes in the enzyme activity of the antioxidant enzymes have been observed only at very high doses [3, 48]. Although only a previous cell culture study has shown a specific effect of a selenium compound on the GPx response to an oxidative insult [36], in experimental conditions similar to those of the present study we have shown that the flavonoid quercetin [18], the olive oil phenol hydroxytyrosol [19] and a coffee melanoidin [20] protect against cell damage by preventing the severely increased activity of antioxidant enzymes induced by t-BOOH. In line with those results, in experiment 2 of the present study we showed, for the first time, that a long-term treatment of human hepatoma cells with Se-MeSeCys prevents the increase in the activity of GPx and GR induced by oxidative stress (Fig. 6).

Conclusions

The results indicate that at the end of an induced stress period the antioxidant defence system of cells that had been pretreated with Se-MeSeCys has more efficiently returned to a steady-state activity, diminishing, therefore, cell damage and enabling the cell to cope in better conditions with further oxidative insults.

In addition, our results support previous data on the chemoprotective effect of Se-MeSeCys and give more insight into its potential biological activity, showing that concentrations of Se-MeSeCys within the physiological range remain unaltered during the treatment and evoke a favourable response in cellular models. Therefore, Se-MeSeCys may contribute to the protection afforded by fruits, vegetables and plant-derived beverages against diseases for which excess production of ROS has been implicated as a casual or contributory factor.

Acknowledgements This work was supported by the grants AGL2000-1314, AGL2004-00302 and CTQ2005-02281 from the Spanish Ministry of Science and Technology (CICYT), and grant CAM-S505/AGR/0312 from the Comunidad Autónoma de Madrid. S.C. has a predoctoral fellowship, R.M. is a postdoctoral fellow and S.R. has a Ramón y Cajal contract, all from the Spanish Ministry of Education.

References

1. El-Sayed WM, Aboul-Fadl T, Lamb JG, Roberts JC, Franklin MR (2006) *Toxicology* 220:179–188
2. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) *Chem Biol Interact* 160:1–40
3. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM (2001) *Nutr Res Rev* 3:79–106
4. Combs GF Jr (2005) *J Nutr* 135:343–347
5. Yu SY, Zhu YG, Li WG (1997) *Biol Trace Elem Res* 56:117–124
6. Finley JW (2003) *J Med Food* 6:19–26
7. El-Bayoumy K, Sinha R (2004) *Mutat Res* 551:181–197
8. El-Bayoumy K, Sinha R, Pinto JT, Rivlin RS (2006) *J Nutr* 136:864S–869S
9. Arnault I, Auger J (2006) *J Chromatogr A* 1112:23–30
10. Milner JA (2001) *J Nutr* 131:1027–1031
11. Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA, Marshall JR, Clark LC (2002) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:630–639
12. Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Garland L, Turnbull BW, Clark LC, Marshall JR (2002) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1285–1291
13. Duffield-Lillico AJ, Slate EH, Reid ME, Turnbull BW, Wilkins PA, Combs GF Jr, Park HK, Gross EG, Graham SF, Stratton MS, Marshall JR, Clark LC (2003) *J Natl Cancer Inst* 95:1477–1481
14. Drake EN (2006) *Med Hypotheses* 67:318–322
15. Brandon EFA, Bosch TM, Deenen MJ, Levink R, Van der Wal E, Van Meerveld JBM, Bijl M, Beijnen JH, Schellens JHM, Meijerman I (2006) *Toxicol Appl Pharmacol* 211:1–10
16. Alia M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L (2005) *J Biochem Mol Toxicol* 19:119–128
17. Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006) *Eur J Nutr* 45:19–28

18. Alía M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L (2006) *Toxicol Appl Pharmacol* 212:110–118
19. Goya L, Mateos R, Bravo L (2007) *Eur J Nutr* 46:70–78
20. Goya L, Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Bravo L, Morales FJ (2007) *Mol Nutr Food Res* 51:536–545
21. Ipolyi I, Stefánka Z, Fodor P (2001) *Anal Chim Acta* 435:367–375
22. Hissin PJ, Hilf R (1976) *Anal Biochem* 74:214–226
23. Mateos R, Goya L, Bravo L (2004) *J Chromatography B* 805:33–39
24. Wang H, Joseph JA (1999) *Free Radic Biol Med* 27:612–616
25. Gunzler WA, Kremers H, Flohe L (1974) *Klin Chem Klin Biochem* 12:444–448
26. Goldberg DM, Spooner RJ (1987) In: Bergmeyer HV (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, pp 258–265
27. Cankur O, Yathavakilla SKV, Caniso JA (2006) *Talanta* 70:784–790
28. Grant TD, Montes-Bayón M, LeDuc D, Fricke MW, Terry N, Caruso JA (2004) *J Chromatogr A* 1026:159–166
29. Pedrero Z, Madrid Y, Cámara C (2006) *J Agric Food Chem* 54:2412–2417
30. Ip C, Thompson HJ, Zhu Z, Ganther HE (2000) *Cancer Res* 60:2882–2886
31. Conley SM, McKay BS, Gandolfi AJ, Stamer WD (2006) *Exp Eye Res* 82:637–647
32. El-Sayed WM, Aboul-Fadl T, Roberts JC, Lamb JG, Franklin MR (2007) *Toxicol In Vitro* 21:157–164
33. Combs GF Jr, Gray WP (1998) *Pharmacol Ther* 79:179–192
34. Wada O, Kurihara N, Yamazaki N (2003) *J Nutr Assess* 10:199–210
35. Raisbeck MF (2000) *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 16:465–480
36. Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F, Pickard K, Lewin MH, Howie AF, Beckett GJ (2001) *Clin Sci* 100:543–550
37. Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Barton S, Lemoch H, Sudhop T, Hoch J, Stockinger K, Spengler U, Sauerbruch T (1997) *Eur J Clin Nutr* 51:266–272
38. Scharf G, Prustomersky S, Knasmüller S, Schulte-Hermann R, Huber WW (2003) *Nutr Cancer* 45:74–83
39. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO (2002) *Free Radic Biol Med* 32:386–393
40. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH (2000) *J Chromatography B* 742:315–325
41. Suttnar J, Masova L, Dyr E (2001) *J Chromatography B* 751:193–197
42. Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC, Levy E (2002) *J Nutr* 132:1289–1292
43. Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B (2002) *Toxicol Sci* 69:149–156
44. Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H (2002) *J Nutr Sci Vitaminol* 48:89–94
45. LeBel CP, Ishiropoulos H, Bondy SC (1992) *Chem Res Toxicol* 5:227–231
46. Rodgers EH, Grant MH (1998) *Chem Biol Interact* 116:213–228
47. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L (1995) *Methods Enzymol* 252:38–114
48. Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi Q-H, Kahl R (2002) *J Nutr* 132:370–375

2.MECANISMOS MOLECULARES DE MUERTE INDUCIDA POR METILMERCURIO EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HEP G2

El mercurio se encuentra presente en todos los compartimentos del medio ambiente y a diferencia de lo que sucede con los compuestos orgánicos su degradación no se produce en el medio. Su facilidad para acumularse en la cadena alimentaria y los diferentes episodios de envenenamiento, han hecho que el mercurio esté incluido en todas las listas de organismos internacionales como uno de los contaminantes más peligrosos presentes en el medio ambiente.

Las principales formas en las que se encuentra el mercurio en el medioambiente son: como mercurio elemental Hg^0 , como mercurio inorgánico Hg^{2+} y en forma orgánica, entre ellas el metilmercurio CH_3Hg^+ . El metilmercurio es más tóxico y más soluble en lípidos que el mercurio inorgánico, y posee elevada afinidad por los grupos tiol presente en los tejidos. Este compuesto se caracteriza por atravesar rápidamente la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica, y además, es un neurotóxico que puede afectar negativamente al desarrollo del cerebro. Además, basándose en su evaluación general, el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos.

Para llevar a cabo el objetivo de evaluar los mecanismos de toxicidad del metilmercurio, se empleó la línea celular de Hepatoma Humano Hep G2. Las células Hep G2 fueron sometidas a un tratamiento con metilmercurio en una dosis de 2 mg/l durante distintos tiempos de incubación: 2,4,8,16 y 24 horas.

En presente estudio a parte de evaluar parámetros relacionados con la viabilidad celular (LDH) y parámetros relacionados con el sistema de defensa antioxidante (glutacion reducido, glutacion peroxidasa, catalasa y glutacion reductasa), se midieron también la actividad de las caspasas y se hicieron análisis por Western blot de los niveles de proteínas de la familia Bcl-2, puesto que las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2 están relacionadas con la apoptosis.

**MECANISMOS MOLECULARES DE MUERTE INDUCIDA POR METILMERCURIO EN
CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO HEP G2**

S.Cuello, L. Goya, Y. Madrid, S. Campuzano, M. Pedrero, L. Bravo, C. Cámara, S. Ramos.

“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells”

Food. Chem. Toxicol., 2010, 48, 389, 1405-14011

Este trabajo fue presentado como comunicación oral en:

“12as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Septiembre, 2008.

“6th International Franco-Spanish workshop on bio-inorganic analytical Chemistry”

, Pau, Francia, Septiembre, 2010.

A Este trabajo le fue concedido un premio por la Sociedad Española de Proteómica
(SEProt) en:

“12as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Septiembre, 2008.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells

Susana Cuello^a, Luis Goya^b, Yolanda Madrid^a, Susana Campuzano^a, Maria Pedrero^a, Laura Bravo^b, Carmen Cámara^a, Sonia Ramos^{b,*}

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

^bDepartamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frio-ICTAN (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2009

Accepted 8 March 2010

Keywords:

Methylmercury

Liver

Antioxidant and detoxificant defences

Cell death

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) has been suggested to exert cytotoxicity through multiple mechanisms, but the precise biochemical machinery has not been fully defined. This study was aimed at investigating the time-course (0–24 h) effect of 2 mg/L MeHg on cell death in human HepG2 cells.

MeHg decreased cell viability in a time-dependent manner, which was concomitant with increased LDH leakage, reduced GSH levels, CAT activity and altered activity of the antioxidant enzymes GPx and GR at the longest times of incubation (16 and 24 h). Activity of the detoxifying enzyme GST was also early enhanced (2 h). Caspase-3 activity reached a maximum value at 8 h and continued increased up to 24 h. This feature was preceded by an enhancement in the caspase-9 activity (2 h), whereas caspase-8 activity remained unchanged. MeHg early diminished Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio and increased levels of the pro-apoptotic Bax and Bad. Moreover, MeHg-induced cytotoxicity was completely inhibited by the antioxidants (GSH and NAC) and notably by the mitochondrial complex I inhibitor rotenone, but not by the NADH oxidase inhibitor DPI.

In summary, MeHg induced an oxidative stress responsible for apoptosis in HepG2 cells through direct activation of the caspase cascade and altered the cellular antioxidant and detoxificant enzymatic system to later provoke necrosis at later stages.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Methylmercury (MeHg) represents a significant environmental contaminant and a well established risk to human health. Most of the knowledge on the toxic effects of MeHg has come from catastrophic episodes of poisoning. The major health disasters in Minamata and Niigata (1950s, Japan) were caused by consumption of fish from waters that were severely polluted with mercury from industrial activities. Another outbreak of poisoning occurred in Iraq (1970s) because grain had been treated with an organomercury fungicide. These accidents revealed that the developing brain is particularly sensitive to the toxic effects of MeHg (Sanfeliu et al., 2003). In this regard, it is well established that MeHg provokes neurotoxicity in humans (Sanfeliu et al., 2003) and in experimental

animals (Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005; Sanfeliu et al., 2003). However, liver is also an important target-organ for MeHg toxicity (Ashour et al., 1993; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005; Mori et al., 2007).

The increased generation of reactive oxygen species (ROS) appears to be a hallmark of MeHg toxicity (de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Shanker and Aschner, 2003; Shenker et al., 1998; Watanabe et al., 2009). It likely occurs in the mitochondria, where MeHg can uncouple oxidative phosphorylation and electron transport (Mori et al., 2007). This oxidative stress provoked by MeHg is related to its high affinity for thiol groups, resulting in the depletion of glutathione (GSH) (de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Shanker et al., 2005; Watanabe et al., 2009). In fact, MeHg decreases GSH content and alters catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities in hepatic tissue and cells, leading to lipid peroxidation and cell death (Ashour et al., 1993; de Freitas et al., 2009; Filipak Neto et al., 2008; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005; Mori et al., 2007). In addition, MeHg exposure induces the opening of permeability transition pore in rat liver mitochondria, which represents an important molecular mechanism responsible for apoptosis (Close et al., 1999; Mori et al., 2007; Shenker et al., 1999).

Many studies have shown the neurotoxic effects of MeHg in cell cultures and animals (Fonfria et al., 2002; Kunimoto, 1994; Mori

Abbreviations: CAT, catalase; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole, diphenyleneiodonium; DTT, dithiothreitol; FBS, fetal bovine serum; GCE, glassy carbon electrode; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GST, glutathione-S-transferase; LDH, lactate dehydrogenase; MeHg, methylmercury; PI-3-kinase, phosphatidylinositol-3-kinase; NAC, N-acetylcysteine; ROS, reactive oxygen species; ROT, rotenone.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 544 56 07; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: sramos@ic.csic.es (S. Ramos).

et al., 2007; Shenker et al., 1999). In this regard, Kunimoto (1994) have demonstrated the ability of MeHg to induce apoptosis in cerebellar neurons in primary culture at low doses, whereas higher concentrations of MeHg-induced necrosis. In addition, it has been suggested that the type of MeHg-induced cell death in neurons depends on the time- and concentration of the contaminant (Castoldi et al., 2000). However, it could be highlighted that the hepatotoxic effects of MeHg remain poorly understood.

HepG2 cells are widely used for biochemical and nutritional studies as a cell culture model of human hepatocytes since they retain their morphology and most of their function in culture (Meerveld et al., 2006). To provide further insights on the mechanism of action of MeHg, it is important to establish the time-course of events after intoxication. Therefore, cells were incubated with MeHg (2 mg/L) at different times (0–24 h) and cell viability (crystal violet), GSH levels, activities of enzymes related to the antioxidant (GPx, GR and CAT) and detoxification (glutathione-S-transferase, GST) system, influence of ROS, as well as modalities of cell death through the measurement of LDH, caspase activities and levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family members have been investigated.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Methylmercury was from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Crystal violet, 4,6-diamidino-2-phenylindole, diphenyleioidonium (DPI), N-acetyl-cysteine (NAC), pyruvate, NADH, rotenone (ROT), glutathione (GSH, reduced form), gentamicin, penicillin G, and streptomycin were purchased from Sigma Chemical. KCl and Na₂H₂EDTA·2H₂O were from Merck and tetrathiafulvalene (TTF) from Aldrich. Anti-Bcl-x, anti-Bax and anti-Bad were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-634, sc-526, and sc-943, respectively). Caspase-3, caspase-8 and caspase-9 substrates (Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AMC and Ac-LEHD-AMC, respectively) were purchased from Pharmingen. Materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad (Madrid, Spain). Cell culture dishes and cell culture medium were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and Biowhittaker Europe (Lonza, Madrid, Spain), respectively. Dialysis membranes (10 K MWCO) were purchased from Cultiex (Madrid, Spain).

All chemicals used were of analytical reagent grade. Water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

2.2. Cell culture and methylmercury treatment

Human hepatoma HepG2 cells were maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. They were grown in DMEM-F12 medium, supplemented with 2.5% fetal bovine serum (FBS) and 50 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. Plates were changed to FBS-free medium 24 h before the assay.

To study the time-course effects of the toxic, cells were incubated with 2 mg/L MeHg and then harvested at different exposure times (0, 2, 4, 6, 8, 16 and 24 h).

In the experiments with MeHg and the antioxidants GSH (1 mM), NAC (1 mM) or the ROS scavengers DPI (20 µM), rotenone (0.5 µM), cells were preincubated with each compound for 1 h prior to MeHg treatment during 24 h.

2.3. Cell viability assay

Cell viability was determined by using the crystal violet assay (Granado-Serrano et al., 2007). In brief, HepG2 cells were seeded at low density (10⁴ cells per well) in 96-well plates, grown for 24 h and incubated with crystal violet (0.2% in 2% ethanol) for 20 min. Then, plates were rinsed with water and allowed to dry, and 1% sodium dodecylsulfate was added. The absorbance corresponding to viable adherent cells was measured using a microplate reader at 560 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2.4. Cytotoxicity assay

Cells were plated in 60-mm diameter plates at a concentration of 1.5×10^5 . Culture medium was collected separately and cells were scraped. Cell suspension was sonicated to ensure breaking down the cell membrane to release the total amount of LDH. A mixture of 5 mM pyruvate, 0.35 mM NADH, and 84 mM Tris was added to the sample and read at 340 nm in a microplate ELISA reader. LDH leakage was estimated as the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content (Granado-Serrano et al., 2006).

2.5. Intracellular reduced glutathione (GSH) levels

Intracellular GSH levels were measured using an amperometric sensor based on a TTF-modified glassy carbon electrode (GCE) (Calvo-Marzal et al., 2006). The method takes advantage of the catalytic oxidation of GSH at low potentials on carbon paste electrodes modified with the TTF-TCNQ complex. After the different times of treatments with MeHg, cells were harvested and homogenized by sonication in 5% trichloroacetic acid and 2 mM EDTA. Lysates were clarified by centrifugation at 7000g for 30 min at 4 °C. Then, a 100 µL aliquot of clear supernatants was added to the electrochemical cell containing 2 mL of supporting electrolyte, and the amperometric measurements were carried out using the GCE. The TTF-modified GCE was prepared as follows: before immobilization of TTF, the GCE (Metrohm 6.0905.010, 3-mm) was polished with 3 µm alumina powder (Metrohm 6.2802.000) for 1 min, and then it was sonicated in deionised water for 1 min and dried with an argon stream. The modification procedure consisted of the deposition of a 3 µL aliquot of a 0.5 M TTF solution (prepared in acetone) on the GCE pretreated surface. Amperometric measurements were performed on a CH1812B Electrochemical Analyser (CH Instruments Inc., USA) by applying in all cases a potential of +200 mV (vs. Ag/AgCl). A BAS MF-2063 Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ reference electrode and a Pt wire counter electrode were also employed.

As no matrix effects were detected, the intracellular GSH concentration was calculated by interpolation of the amperometric signal from the sample solutions into a calibration graph constructed with standard GSH solutions (1.0×10^{-4} to 1.0×10^{-3} M) prepared in 0.1 M phosphate buffer solution containing 0.1 M KCl and 0.5 mM Na₂H₂EDTA·2H₂O (to minimize GSH oxidation by metal ions present in the sample) at pH 7.0.

2.6. Determination of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) activities

For the assay of the GPx, GR and CAT activities, treated cells (4×10^6) were suspended in PBS and centrifuged at 300g for 5 min to pellet cells. Cell pellets were resuspended in 20 mM Tris, 5 mM EDTA, and 0.5 mM mercaptoethanol, sonicated, and centrifuged at 3000g for 15 min. Enzyme activities were measured in the supernatants and protein was measured by the Bradford reagent. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using *tert*-butyl hydroperoxide as a substrate, coupled to the disappearance of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) by GR (Gunzler et al., 1974). GR activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione (Goldberg and Spooner, 1987). CAT activity was determined by following the decomposition of H₂O₂ measured as a decrease in absorbance at 240 nm (Aebi, 1987) and expressed as mU/mg protein.

GST activity was analysed by using a commercial GST fluorometric assay kit (BioVision, CA, USA). The assay utilizes monochlorobimane (MCB), a dye that reacts with GSH, to determine the total GST activity. Briefly, HepG2 treated cells were collected in PBS and centrifuged at low speed (5 min, 300g). Cell pellets were resuspended in sample buffer, sonicated for 10 min and centrifuged at 3000g for 15 min. The GST activities in the supernatants were detected in a fluorescent microplate reader at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm.

2.7. Fluorometric analysis of caspases-3, -8 and -9 activities

Cells were lysed in a buffer containing 5 mM Tris (pH 8.0), 20 mM EDTA and 0.5% Triton X-100. For caspase-3 activity, reaction mixture contained 20 mM HEPES (pH 7.0), 10% glycerol, 2 mM dithiothreitol (DTT), 50 µg protein per condition and 20 µM Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. Reaction mixture for caspase-8 activity contained 20 mM piperazine, *N,N*-Bis(2-ethane sulfonic acid) (pH 7.2), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 10% sucrose, 70 µg protein per condition and 22.6 µM Ac-IETD-AMC (N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. Assay buffer for caspase-9 consisted of 25 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10 mM dithiothreitol, 10% sucrose, 70 µg protein per condition and 20 µM Ac-LEHD-AMC (N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. Enzymatic activity was monitored at an excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 440 nm.

2.8. Western blot analysis

To analyse Bcl-x, Bax and Bad protein levels, cells were lysed in 25 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 5 µg/ml leupeptin and the supernatants clarified by centrifugation at 12,000g for 10 min. Later, the protein concentration of cell lysates was analysed, by using the Bradford reagent. Equal amounts of proteins (100 µg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to polyvinylidene difluoride filters (PVDF, Protein Sequencing Membrane, BioRad) that were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated

anti-rabbit immunoglobulin. Western blots were developed with ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization was ensured by β -actin and bands were quantified using a scanner and accompanying software.

2.9. Statistics

Statistical analysis of data was as follows. Prior to analysis data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way analysis of variance was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$ SPSS version 15.0 was used.

3. Results and discussion

3.1. Cell viability

To determine the effects of MeHg on HepG2 cell viability after 24 h of incubation, two different doses commonly used in the literature were tested (1 and 2 mg/L). In this regard, 1 mg/L MeHg did not affect to HepG2 cell viability after 24 h of treatment (data not shown), whereas 2 mg/L MeHg induced a significant reduction (Table 1). Therefore, this dose was selected to study the effects of MeHg on HepG2 cells in a time-course manner. Correspondingly, concentrations of MeHg higher than 1 mg/mL showed toxic effects in MCF-7 breast cancer cells, whereas lower doses promoted cell growth by stimulating genetic modifications (Surocheva et al., 2005).

To test the potential time-dependent cytotoxic effect of MeHg in HepG2 cells, cell viability and intracellular LDH released to the culture medium were analysed. The study of the relative density of cell adherents (crystal violet) showed that MeHg caused a dramatic decrease of HepG2 cell viability at times over 8 h (Table 1). However, the membrane damage, as LDH leakage, was observed from 16 h onwards (Table 1). These features indicate that MeHg induces a necrotic damage at the longest incubation times, as previously shown in the liver from fishes receiving contaminated food (Mela et al., 2007). In addition, MeHg-induced cytotoxicity has also been reported in various types of cells including rat hepatocytes (Ashour et al., 1993; Hussain et al., 1999), rat cerebellar granule cells (Kunimoto, 1994), human breast cells (Surocheva et al., 2005), mouse peritoneal neutrophils (Kuo and Lin-Shiau, 2004) and human lymphocytes and monocytes (Shenker et al., 1997, 1999).

3.2. Intracellular GSH levels

GSH is the main non-enzymatic antioxidant defence within the cell and plays an important role in protection against oxidative stress, as a substrate in GPx-catalysed detoxification of organic peroxides, by reacting with free radicals and by repairing free-rad-

ical-induced damage through electron-transfer reactions (Masella et al., 2005).

In cells treated with MeHg, after an early and transient increase in the GSH levels (4 and 8 h), GSH content showed a decrease at 16 h up to 24 h (Table 2). An early increased GSH content has also been reported in the liver of rats and mice contaminated with MeHg (Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005). Similarly, high GSH blood levels have been described in women exposed to high concentrations of MeHg (do Nascimento et al., 2008). This biochemical response seems to provide a protective effect to reduce the MeHg-induced oxidative stress (do Nascimento et al., 2008; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005) and shows the resistance of the hepatic cells against the oxidative damage (Mori et al., 2007). However, longer exposures to MeHg through diet led to a reduced GSH content in the liver of rats (Ji et al., 2005). Likewise, GSH depletion has been observed in isolated rat hepatocytes after incubation with 1–100 mg/L MeHg (Ashour et al., 1993), as well as in human monocyte, human T-cells (Shenker et al., 1998, 2002) and neural cells (de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Watanabe et al., 2009). In this regard, the decreased GSH intracellular levels, which constitute one of the harmful biological effects of MeHg, could be explained by the high reactivity of the toxic towards thiol groups (Dutczak and Ballatori, 1994). Consequently, GSH depletion could be due to the binding of MeHg with GSH to form mixed compounds GSH–Hg (–S–Hg; –S–Hg–S) (Dutczak and Ballatori, 1994; Shenker et al., 2002). In addition, GSH depletion was coincident with the increased LDH leakage and diminished cell viability (Table 1), indicative of membrane injury and suggestive of necrosis as a later event in the MeHg-induced HepG2 cell death, which could contribute to a potential passive efflux of GSH across the damaged membrane.

3.3. Antioxidant and detoxifying enzymes activity

In the defence against oxidative stress, the cellular antioxidant enzyme system plays a crucial role, since their activities are essential for the intracellular quenching of cell-damaging peroxide species and the effective recovery of the steady-state concentration of GSH (Masella et al., 2005). Moreover, changes in the activity of antioxidant enzymes can be considered as biomarkers of the antioxidant response (Masella et al., 2005). CAT converts H_2O_2 to H_2O , GPx catalyses GSH oxidation to oxidized glutathione (GSSG) at the expense of H_2O_2 or other peroxides and GR recycles GSSG back to GSH (Masella et al., 2005).

GPx activity was increased after 24 h of incubation with MeHg, whereas at that time, GR activity decreased (Fig. 1). These results are in agreement with previous studies that have demonstrated an increased GPx activity, as well as a decreased or unaltered GR activity, in isolated rat hepatocytes, in mitochondria of rat liver and in the liver of rats exposed to MeHg (Ashour et al., 1993; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005; Mori et al., 2007). Moreover, Franco et al. (2009) have clearly demonstrated that GPx is an important target for MeHg-induced toxicity and seems to be essential for

Table 1
Time-course effect of MeHg (2 mg/L) on LDH leakage and cell viability (crystal violet assay).^a

Time (h)	LDH leakage (% LDH in medium)	Crystal violet (% of viable cells)
0	0.8 ± 0.3 ^a	100 ± 9 ^a
2	0.9 ± 0.4 ^a	98 ± 19 ^b
4	1.1 ± 0.4 ^a	94 ± 26 ^b
8	1.9 ± 0.5 ^a	98 ± 14 ^b
16	20 ± 2 ^a	33 ± 8 ^a
24	49 ± 4 ^a	30 ± 7 ^a

^a Cell viability was determined as relative percent of crystal violet stained control cells. Results of LDH leakage are expressed as percent of LDH activity in the culture medium of the total activity, culture medium plus intracellular. Data represent the means (±SD) of 6–8 different samples per conditions. Means in a column without a common letter differ, $P < 0.05$.

Table 2
Time-course effect of MeHg (2 mg/L) on GSH levels.^a

Time (h)	nmol GSH/mg protein
0	84 ± 1 ^a
2	89 ± 32 ^a
4	150 ± 13 ^b
8	166 ± 20 ^b
16	78 ± 1 ^c
24	77 ± 7 ^c

^a Data represent the means (±SD) of 6–8 different samples per conditions. Means in a column without a common letter differ, $P < 0.05$.

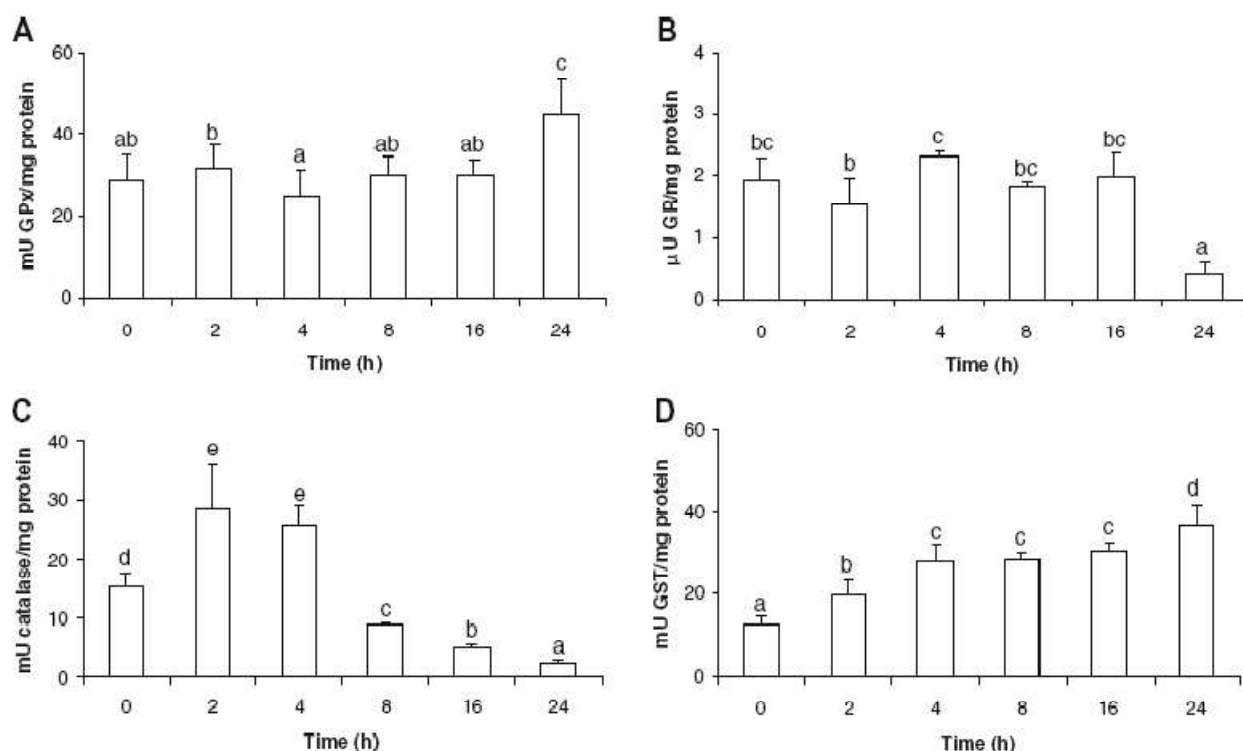


Fig. 1. Time-course effect of MeHg (2 mg/L) on the activity of (A) glutathione peroxidase, (B) glutathione reductase (C) catalase and (D) glutathione-S-transferase. Values are means \pm SD ($n = 4-6$). Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

counteracting the pro-oxidant effects of MeHg. In line with this, the enhancement in GPx activity has been directly related to the increase of Hg content in the liver (Hussain et al., 1999), whereas the diminished GR activity has been associated to the conjugation of MeHg with the active site of the enzyme (Ashour et al., 1993). These modifications in the activities of GPx and GR could also be connected with the depletion of GSH levels. Nevertheless, a decrease in GSH content, without alteration of GPx and GR activities, was already detected after 16 h of exposure to MeHg. We believe that the initial depletion of GSH (16 h) could result from the use of GSH as a conjugating agent to form a GSH-metal complex, which is a common mechanism for the removal of MeHg in hepatic cells (Dutczak and Ballatori, 1994), as well as by an increased consumption in GSH in quenching ROS generated by MeHg (Chen et al., 2006; de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Watanabe et al., 2009). At longer exposure (24 h), GPx activity would increase as an additional cellular mechanism of defence against MeHg-induced cell damage, whereas GR remained inactivated by Hg. A comparative study in brain and liver cells from rats treated with 10 mg/kg day MeHg for 5 days has recently shown a decrease in GPx activity and GSH content in the brain of rats in contrast to an increased GPx activity and unaltered GSH levels in the liver of the animals (Mori et al., 2007). These results demonstrate the high resistance of liver to oxidative stress and its ability to suppress ROS generation and promote ROS elimination.

CAT activity increases after 2 and 4 h of incubation with MeHg and then, from 8 h onwards starts to decrease (Fig. 1). In line with this, a decrease in GSH levels and CAT and GR activities has been reported in hepatocytes treated with this toxic and in the liver of mice after long exposures to MeHg (de Freitas et al., 2009; Filipak Neto et al., 2008), indicating the severity of the oxidative stress induced during exposure to MeHg. Interestingly, shorter exposures to the contaminant or intoxication with low MeHg doses lead to an increased activity of CAT (Filipak Neto et al., 2008; Hussain

et al., 1999), in agreement with our results. Moreover, under these experimental conditions, cell viability is less affected than after exposure to higher doses or longer incubation times (Filipak Neto et al., 2008).

GST is an important family of isoenzymes that catalyse the reaction of endogenous GSH with numerous electrophiles to yield less toxic conjugates that are easily eliminated (Masella et al., 2005). An enhancement of GST activity was observed after 2 h of incubation of HepG2 cells with MeHg and continued increasing up to 24 h, when it showed the highest values in comparison to untreated cells. This enhanced GST activity could be related to the cellular detoxification of MeHg. In agreement with these results, some studies point to the induction of GST as a mechanism to protect against oxidative stress by increasing the metabolism of electrophilic intermediates and ROS (Masella et al., 2005).

3.4. Apoptosis pathway

To test whether MeHg-induced cell death involved apoptotic routes in HepG2 cells, caspases-3, -8 and -9 activities were assayed. No activation of caspase-8 was observed when cells were treated with 2 mg/L MeHg, whereas caspase-9 activity increased at 2 and 4 h. After 8 h of incubation, caspase-3 activity increased and remained enhanced up to 24 h as compared to untreated cells (Table 3). In line with these results, the induction of apoptosis has been demonstrated in lymphocytes (Close et al., 1999; Shenker et al., 1999, 2002), neural (Franco et al., 2009; Tamm et al., 2006), pancreatic (Chen et al., 2006) and leukemia cells (Araragi et al., 2003; Shenker et al., 2002) with MeHg concentrations similar to those used in the present study and at longer incubation times. In addition, mitochondrial alterations such as liberation of cytochrome c (Close et al., 1999; Chen et al., 2006; Fonfria et al., 2002; Shenker et al., 1999; Tamm et al., 2006) and alterations in mitochondria transmembrane potential (Close et al., 1999; Shen-

Table 3
Time-course effect of MeHg (2 mg/L) on caspases activities.*

Time (h)	Caspase-3 activity (% of control)	Caspase-8 activity (% of control)	Caspase-9 activity (% of control)
0	100 ± 4 ^a	100 ± 7 ^a	100 ± 2 ^a
2	99 ± 9 ^a	102 ± 14 ^a	119 ± 5 ^b
4	109 ± 6 ^a	103 ± 15 ^a	107 ± 4 ^b
8	125 ± 12 ^b	97 ± 7 ^a	105 ± 3 ^{ab}
16	154 ± 17 ^c	101 ± 14 ^a	105 ± 4 ^{ab}
24	170 ± 15 ^c	99 ± 17 ^a	105 ± 4 ^{ab}

* The results of the fluorometric analysis for caspases activities are expressed as percent of control value ± SD of six to eight different samples per condition. Means in a column without a common letter differ, $P < 0.05$.

ker et al., 2002; Tamm et al., 2006) have been reported, which have been related to the activation of caspase-9 (Araragi et al., 2003; Fonfria et al., 2002; Shenker et al., 2002). The involvement of the intrinsic pathway to induce apoptotic cell death points to an important role of the mitochondria in this process. As mentioned above, it has been demonstrated that MeHg accumulates in the hepatic mitochondria (Mori et al., 2007), leading to an enhanced generation of ROS (Shenker et al., 1999, 2002) and activation of the mitochondrial apoptotic pathway (Fonfria et al., 2002; Shenker et al., 2002).

After long time of incubation (16–24 h) with MeHg, depletion of GSH levels together with decreased cell viability and increased apoptosis have been demonstrated (Franco et al., 2009; Shenker et al., 2002) in agreement with the present results, as well as enhanced necrosis, evidenced by increased LDH leakage. On the other hand, activation of caspases was only observed at shorter incubation times (2–8 h), while LDH leakage and cell viability were similar to those of control cells, demonstrating that initiating apoptotic features preceded necrotic ones. As pointed out previously, the early and transient enhancement of GSH levels suggest a protective step aimed at reducing the MeHg-induced oxidative stress (do Nascimento et al., 2008; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005), which was coincident with the activation of caspase-9, an early indicator of apoptosis induction.

3.5. Anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family members

The proteins of the Bcl-2 family include pro- and anti-apoptotic members, and the balance in the expression of these proteins is one of the major mechanisms that determine the ultimate fate of cells in the apoptosis/survival process (MacFarlane and Williams, 2004). In fact, Bcl-2 family members partly regulate the release of cytochrome *c* from the mitochondria, showing the connection between this family of proteins and this organelle during programmed cell death (MacFarlane and Williams, 2004). Therefore, to further investigate whether the MeHg-induced apoptosis in HepG2 cells was associated with the modulation of the members of this family of proteins, the expression of Bcl-x, Bax and Bad was examined.

Bcl-x_L is an anti-apoptotic protein, but its cleavage product, Bcl-x_S, has a pro-apoptotic function (Granado-Serrano et al., 2006). MeHg decreased Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio from 2 h onwards (Fig. 2A and B), which was coincident with caspase-9 activation. This suggests that MeHg-induced apoptosis in HepG2 cells is an early process that alters Bcl-x, being Bcl-x_L a caspase substrate, at least in part (Granado-Serrano et al., 2006).

Bax and Bad are pro-apoptotic Bcl-2 proteins that contribute to induce apoptosis by promoting changes in the mitochondria leading to the release of the cytochrome *c* and other pro-apoptotic factors from this organelle (MacFarlane and Williams, 2004). MeHg induced an enhancement of Bax and Bad levels from 4 up to 16 h, when the maximum values were reached, showing similar

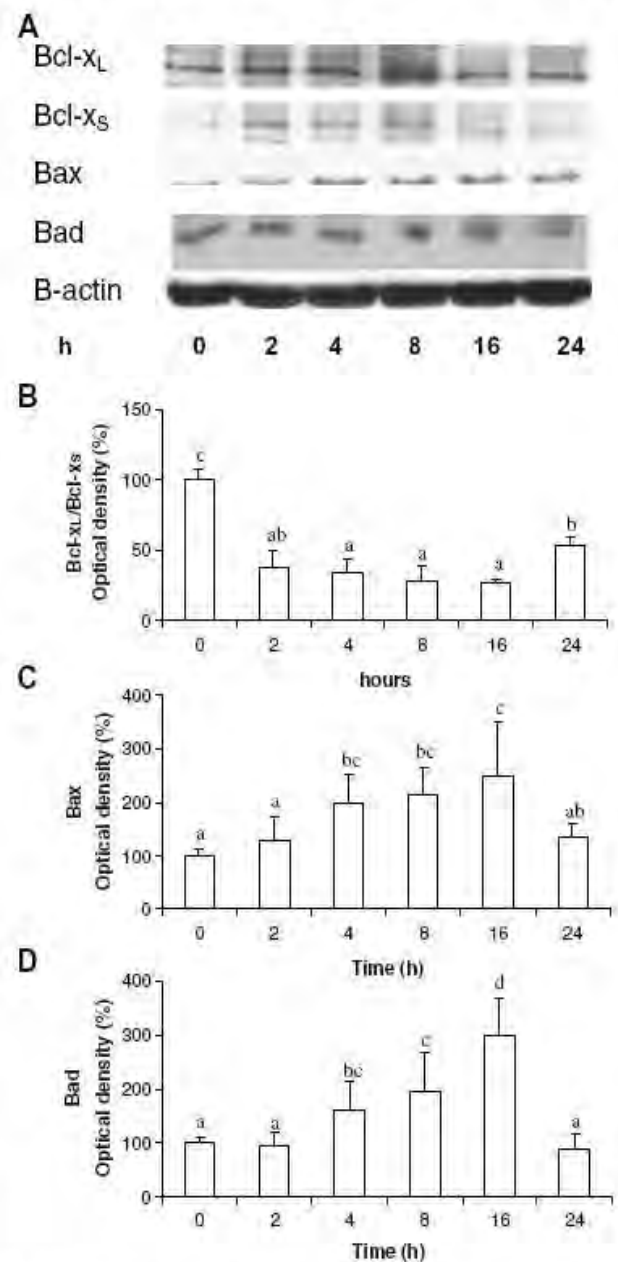


Fig. 2. Time-course effect of MeHg (2 mg/L) on levels of Bcl-x_L/Bcl-x_S, Bax and Bad. (A) Bands of representative experiments. (B) Densitometric quantification of the Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio. (C) Densitometric quantification of Bax. (D) Densitometric quantification of Bad. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means ± SD, $n = 4$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

levels to those of untreated cells after 24 h of incubation (Fig. 2A, C and D). Thus, MeHg triggers apoptosis by modulating Bcl-2 family members, i.e. enhancing the levels of pro-apoptotic proteins (Bax and Bad) and decreasing Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio. Additionally, it should be mentioned that after 24 h of exposure to MeHg, similarly to what is observed after 16 h of incubation, apoptotic cell death coexisted with necrosis. However, at the longest time tested (24 h), it seems that necrosis cell death would predominate over apoptosis, in agreement with previous studies on cerebellar granule cells (Castoldi et al., 2000).

The imbalance in the expression of Bcl-2 pro- and anti-apoptotic proteins to control MeHg-induced apoptosis has been discussed in other models. In this regard, Tamm et al. (2006) have reported

that MeHg provoked apoptosis in neural stem cells by the increase of Bax expression levels and Shenker et al. (1997) have demonstrated a relationship among MeHg-induced apoptosis, the lack of Bcl-2 phosphorylation and the unchanged levels of Bax (Close et al., 1999). Moreover, in cells expressing high levels of anti-apoptotic Bcl-2, an increase of cell tolerance to MeHg-induced apoptosis and attenuated ROS production has been described (Close et al., 1999; Sarafian et al., 1994). However, in cells with low levels of anti-apoptotic Bcl-2, MeHg provoked apoptotic cell death by inducing mitochondrial dysfunction (Close et al., 1999), which demonstrates that Bcl-2 proteins play an important role in the MeHg-induced apoptosis.

3.6. Effects of preincubation with antioxidants and ROS scavengers on cell viability

MeHg is considered to exert its toxicity by increasing ROS generation, an effect that could be sufficient to induce cell death (Castoldi et al., 2000; de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Shanker and Aschner, 2003; Shanker et al., 2005; Shenker et al., 1998, 1999, 2002; Watanabe et al., 2009). However, ROS may originate from the cytosolic NADH oxidase and from the mitochondria. In an attempt to localize the source of the ROS, cells were incubated with two antioxidants (NAC and GSH) and with rotenone, an inhibitor of complex I in the mitochondrial respiratory chain, to evaluate the role of mitochondrial ROS and with the cytosolic ROS scavenger DPI.

Pretreatment of HepG2 cells with NAC (1 mM) or GSH (1 mM) completely reverted the cytotoxicity induced by MeHg after 16 h (data not shown) and 24 h of incubation (Fig. 3), suggesting the effectiveness of both compounds on blocking mitochondrial ROS production. ROT has been reported to reduce basal ROS levels by limiting the electron flow into complex III in the mitochondria, which is the main site for ROS production in this organelle (Chen et al., 2003). Hence, in our conditions, ROT treatment recovered cell viability to values close to those of controls (Fig. 3). However, preincubation with DPI (20 μ M) was completely ineffective in rescuing cells, since the percentage of viable cells was comparable to that of MeHg-treated cells (Fig. 3). This supports that NADH oxidase-derived ROS do not contribute significantly to the increased ROS levels induced by MeHg in HepG2 cells.

In this regard, it has been demonstrated that the diminished cell viability elicited by MeHg might be prevented by the use of antioxidants as block the deleterious effects promoted by MeHg-induced ROS formation (Chen et al., 2006; de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Watanabe et al., 2009). This observation suggests that

oxidative stress induction is upstream in the cell death cascade and is critical for the activation of death-signalling pathways, in agreement with the present results (de Melo Reis et al., 2007; Fonfria et al., 2002; Kaur et al., 2007; Vitagliano et al., 2004; Watanabe et al., 2009), which point to the mitochondria as a target-organelle for MeHg (Araragi et al., 2003; Close et al., 1999; Fonfria et al., 2002; Mori et al., 2007; Shenker et al., 1999, 2002; Tamm et al., 2006). Thus, blockage of the electron flow between mitochondrial complexes I and III by ROT subsequently leads to the inhibition of ROS production in intact mitochondria, although it significantly increases H_2O_2 production in submitochondrial particles (Chen et al., 2003). This could explain the remarkable recovery in cell viability observed after 24 h of incubation with the toxic and ROT, and shows the involvement of mitochondria in ROS formation and its requirement for cell death induction.

In addition, enhanced ROS generation contributes to GSH consumption at long incubation times (16 and 24 h), as mentioned above. In this regard, it has been suggested that inhibition of GSH synthesis promotes MeHg toxicity by reducing cell viability (Watanabe et al., 2009) and modulation of intracellular GSH stores is critical in determining apoptosis sensitivity and resistance in cells (Friesen et al., 2004) in agreement with the present results.

In summary, MeHg induces an oxidative stress that activates the apoptotic intrinsic pathway in HepG2 cells together with an increased detoxificant GST activity. However, longer exposures to MeHg provoke GSH depletion and membrane damage, both related to necrotic cell death, as well as alteration of antioxidant enzyme activities.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Grants 910382-681, AGL2004-302, AGL2007-64042, CTQ2008-01031, CSD2007-00063 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and Comunidad de Madrid N° ref.: (S-0505/AGR/0312). S. Cuello thanks to Ministry of Education and Science for the FPU predoctoral fellowship.

References

- Aebi, H., 1987. Catalase. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, Germany, pp. 273–282.
- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M., Sato, M., 2003. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 184, 1–9.
- Ashour, H., Abdel-Rahman, M., Khodair, A., 1993. The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 69, 87–96.
- Calvo-Marzal, P., Chumbimuni-Torres, K.Y., Höehr, N.F., Kubota, L.T., 2006. Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte with amperometric sensor based on TTF-TCNQ. *Clin. Chim. Acta.* 371, 152–158.
- Castoldi, A.F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C., Manzo, L., 2000. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J. Neurosci. Res.* 59, 775–787.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnfsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 278, 3028–3031.
- Chen, Y.W., Huang, C.F., Tsai, K.S., Yang, R.S., Yen, C.C., Yang, C.Y., Lin-Shiau, S.Y., Liu, S.H., 2006. Methylmercury induces pancreatic beta-cell apoptosis and dysfunction. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1080–1085.
- Close, A.H., Guo, T.L., Shenker, B.J., 1999. Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* 49, 68–77.
- de Freitas, A.S., Funck, V.R., dos Santos Rotta, M., Bohrer, D., Mörschbacher, V., Puntel, R.L., Wayne Nogueira, C., Farina, M., Aschner, M., Teixeira-Rocha, J.B., 2009. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res. Bull.* 79, 77–84.
- de Melo Reis, R.A., Herculano, A.M., da Silva, M.C.C., dos Santos, R.M., do Nascimento, J.L.M., 2007. In vitro toxicity induced by methylmercury on sympathetic neurons is reverted by L-cysteine or glutathione. *Neurosci. Res.* 58, 278–284.

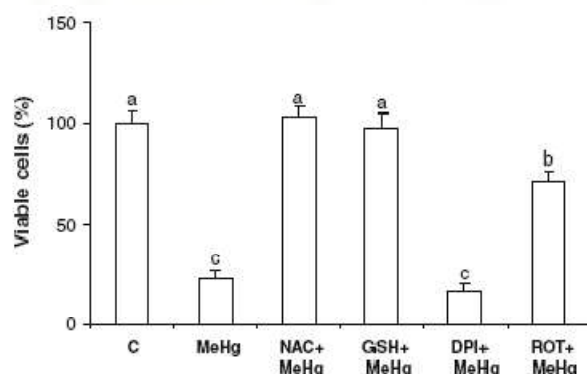


Fig. 3. Effects of MeHg and NAC, GSH, ROT or DPI on cell viability. HepG2 cells were incubated with 2 mg/L MeHg for 24 h in the presence or absence of 1 mM NAC, 1 mM GSH, 0.5 μ M ROT or 20 μ M DPI. Different letters on bars denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

- do Nascimento, J.L.M., Oliveira, K.R.M., Crespo-Lopez, M.E., Macchi, B.M., Mues, L.A.L., Pinheiro, M.C.N., Silveira, L.C.L., Herculanio, A.M., 2008. Methylmercury neurotoxicity and antioxidant defenses. *Indian J. Med. Res.* 128, 373–382.
- Dutczak, W.J., Ballatori, N., 1994. Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *J. Biol. Chem.* 269, 9746–9751.
- Filipak Neto, F., Zanata, S.M., Silva de Assis, H.C., Nakao, L.S., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol. in Vitro* 22, 1705–1713.
- Fonfria, E., Dare, E., Benelli, M., Sunol, C., Ceccatelli, S., 2002. Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2013–2016.
- Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., Baily, A.C.D., Marques, M.R., Dafre, A.L., Farina, M., 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. Med.* 47, 449–457.
- Friesen, C., Kiess, Y., Debatin, K.M., 2004. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ.* 11, 573–585.
- Goldberg, D.M., Spooner, R.J., 1987. Glutathione reductase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, pp. 258–265.
- Granado-Serrano, A., Martin, M., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Nutr.* 136, 2715–2721.
- Granado-Serrano, A., Martin, M., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S., 2007. Molecular mechanisms of (–)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J. Agr. Food Chem.* 55, 2020–2027.
- Gunzler, W.A., Kremers, H., Flohe, L., 1974. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase. *Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 444–448.
- Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J., Khan, A.T., 1999. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health Part B* 34, 645–660.
- Ji, X., Wang, W., Cheng, J., Yuan, T., Zhao, X., Zhang, H., Qu, L., 2005. Free radicals and antioxidant status in rat liver after dietary exposure of environmental mercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22, 309–314.
- Kaur, P., Aschner, M., Syversen, T., 2007. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. *Toxicology* 230, 164–177.
- Kunimoto, M., 1994. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 310–317.
- Kuo, T.C., Lin-Shiau, S.Y., 2004. Early acute necrosis and delayed apoptosis induced by methyl mercury in murine peritoneal neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94, 274–281.
- MacFarlane, M., Williams, A.C., 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Report* 5, 674–678.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Fiesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16, 577–586.
- Meerveld, J.B.M., Bijl, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., Meijerman, L., 2006. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies: genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporters polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 1–10.
- Mela, M., Randi, M.A.F., Ventura, D.F., Carvalho, C.E.V., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 68, 426–435.
- Mori, N., Yasutake, A., Hirayama, K., 2007. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.* 81, 769–776.
- Sanfeliu, C., Sebastia, J., Cristofol, R., Rodríguez-Farré, E., 2003. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.* 5, 283–306.
- Sarafian, T.A., Vartavarian, L., Kaneb, D.J., Bredesen, D.E. and Verity, M.A., 1994. bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol. Lett.* 74, 149–155.
- Shanker, G., Aschner, M., 2003. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Mol. Brain Res.* 110, 85–91.
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, J.L., Aschner, M., 2005. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 11–22.
- Shenker, B.J., Datar, S., Mansfield, K., Shapiro, I.M., 1997. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 397–406.
- Shenker, J., Guo, T.L., Insug, O., Shapiro, I.M., 1998. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence mitochondrial dysfunction. *Environ. Res.* 77, 149–159.
- Shenker, J., Guo, T.L., Insug, O., Shapiro, I.M., 1999. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157, 23–35.
- Shenker, B.J., Pankoski, L., Zekavat, A., Shapiro, I.M., 2002. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antiox. Redox Signal.* 4, 379–389.
- Surocheva, O.A., Yang, Y., Gierthy, J.F., Seegal, R.F., 2005. Methyl mercury influences growth-related signaling in MCF-7 breast cancer cells. *Inc. Environ. Toxicol.* 20, 32–44.
- Tamm, C., Duckworth, J., Hermason, O., Ceccatelli, S., 2006. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 97, 69–78.
- Vitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., Fogliano, V., 2004. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 575–586.
- Watanabe, J., Nakamachi, T., Ogawa, T., Naganuma, A., Nakamura, M., Shioda, S., Nakajo, S., 2009. Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 34, 315–325.

3. ESTUDIOS DE ACUMULACIÓN EN EL PEZ CEBRA

La Unión Europea recientemente ha desarrollado una nueva normativa europea de Registro de Productos Químicos (REACH). Concretamente, en el REACH se indica que la bioacumulación de una sustancia química en un organismo, es una de las propiedades intrínsecas más importantes que determinan el potencial de peligro para el medio ambiente, y se señala que se requerirán datos del potencial de bioconcentración para un gran número de compuestos químicos con producciones superiores a las 100 Tm/año. En este sentido, y según un estudio de Pedersen *et al*, se estima en más de 3,000 los compuestos químicos de los que se deberán aportar datos de bioconcentración, obtenidos siguiendo el único método validado actualmente, y que es el Test de Bioconcentración de la OCDE (OCDE/305), que mide la acumulación de un compuesto disuelto en agua en peces adultos. Para obtener el factor de bioconcentración (BCF) de un compuesto siguiendo ese método, es necesario realizar un complejo ensayo, cuyo coste se estima en más de 100.000 € por compuesto, siendo requeridos al menos 108 peces por ensayo para poder obtener ese dato.

Tanto por el importante coste de estos estudios, como también por implicar el sacrificio de un importante número de peces, resulta evidente la importancia de desarrollar y validar nuevos métodos alternativos que permitan refinar, reducir y/o remplazar el número de animales utilizados.

Por este motivo, el presente estudio tiene como objetivo: desarrollar un método para la determinación del factor de bioconcentración utilizando larvas de pez cebra y que sirva como alternativa al ensayo 305 de la OCDE con peces adultos.

En el primer trabajo **“Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC–ICP-MS. Talanta 82 (2010) 594-599”** se llevó a cabo la optimización de la metodología analítica empleada para la extracción de mercurio en micromuestras, puesto que aproximadamente el peso de diez embriones de pez cebra es de 5 mg. Para la extracción de mercurio se empleó una hidrólisis ácida y se optimizó la sonda de ultrasonidos variando el tiempo de sonicación y la concentración de ácido clorhídrico. Las condiciones de extracción de metilmercurio óptimas fueron: la concentración de ácido 7M, tiempo de sonicación 5 minutos y

potencia de la sonda 40%. Por otro lado se optimizó también un método de hidrólisis enzimática cuya condiciones óptimas fueron: 0.75 % (w/v) proteasa XIV y 2.5% 2-mercaptoetanol. Para la optimización de los dos tipos de extracciones se utilizó un material de referencia de atún certificado en metilmercurio: $2,86 \pm 0,16$ mg/kg. Con estos método de extracción se llegaron a obtener recuperaciones cuantitativas del material de referencia con una cantidad de muestra de 5 mg, esto es importante puesto que el peso de los embriones del pez cebra es de tan solo 5 mg y se necesita de un método capaz de extraer de forma cuantitativa el mercurio en pequeñas cantidades de muestra, como es este caso.

En la segunda publicación **"Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model. Talanta 89 (2012) 169-177"** la metodología optimizada se aplicó a las larvas de pez cebra que fueron expuestas a distintas dosis de MeHg (1 y 10 ppb). En el mismo trabajo también se optimizó una metodología para la extracción de selenio, y la larvas fueron sometidas a las mismas dosis que con el MeHg (1 y 10 ppb). El objetivo del presente estudio es la obtención de factores de bioacumulación (para metilmercurio y selenito) que estén en concordancia los datos de bioacumulación ya existentes en las bases de datos y en la literatura, con la intención de usar las larvas de pez cebra como modelo alternativo al OECD/305, el cual, como se ha comentado antes, es un modelo costoso, se necesita un número elevado de peces adultos para llevar a cabo el ensayo y se necesita 42 días para obtener los resultados de los factores de bioacumulación. La ventaja que tiene el método que se quiere proponer en este trabajo usando las larvas de pez cebra sobre OECD/305 es que no son consideradas animales de laboratorio según la Directiva 2010/63/EU y, además, la duración del ensayo es de 72 horas: hay una primera etapa, denominada de absorción, en la que se exponen las larvas al compuesto químico (en este caso mercurio o selenio) durante 48 horas, y una segunda etapa de depuración (24 horas), donde las larvas son expuestas al medio de cultivo en ausencia del compuesto químico. Los factores de bioacumulación obtenidos para el metilmercurio fueron 5000 y 2333 para larvas expuestas a 1 y 10 ppb, respectivamente, mientras que para el selenito el factor de bioacumulación fue 74 para larvas expuestas a 10 ppb. Existe una buena correlación entre los datos

experimentales obtenidos en este estudio con los ya existentes en la literatura, lo que indica que el método propuesto es una prometedora alternativa al método de la OECD/305

**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO DE EXTRACCIÓN Y ESPECIACIÓN DE
MERCURIO EMPLEANDO LA MICROSONDA DE ULTRASONIDOS SEGUIDO DE LC-ICP-
MS**

I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid

“Approach for rapid extraction and speciation of mercury using ultrasonic probe
followed by LC-ICP-MS”

Talanta, 2010, 82, 594-599

Este trabajo fue presentado como poster en:

“Society of Environmental Toxicology and Chemistry”, Oporto, Portugal, Mayo, 2007.

“IX International Symposium on analytical methodology in the
environmental field”, Mallorca, España, Octubre, 2007.



Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC–ICP–MS

Isabel López, Susana Cuello, Carmen Cámara, Yolanda Madrid*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2010

Received in revised form 29 April 2010

Accepted 10 May 2010

Available online 20 May 2010

Keywords:

Extraction

Ultrasonic probe

2-Mercaptoethanol

Biological samples

Mercury speciation

ABSTRACT

A fast method for mercury extraction from biological samples based on the use of HCl leaching plus different enzymatic hydrolysis (with and without mercury complexing agents), and the use of focussed ultrasounds (2-mm microtip) is here proposed. Total mercury content in several biological samples was determined by FI–ICP–MS using a carrier solution consisting of 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol, to avoid memory effect, and 0.15% (w/v) KCl. For mercury speciation a RP18 chromatographic column coupled to ICP–MS was used. A mobile phase consisting of 0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 2% (v/v) methanol, and 0.02% (w/v) mM L-cysteine at pH 2.1 was used for chromatographic separation of the mercury species in the sample extracts. Extraction procedures were validated by using 50 mg of tuna fish tissue CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \text{ mg kg}^{-1}$ for methylmercury). The recoveries obtained were $99 \pm 3\%$ and $93 \pm 1\%$ after acid leaching (HCl 7 M) and enzymatic extraction (15 mg protease type XIV in 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol), respectively. The optimal sonication conditions (5 min of exposure time and 40% of ultrasound amplitude) were applied to 5 mg of CRM-463 ($88 \pm 5\%$), 5 mg of mussel tissue ($81 \pm 11\%$) and to 2 mg of zebra fish embryos ($90 \pm 10\%$) obtaining good recoveries in all cases. Methylmercury was found to be the most abundant Hg species in all samples. The developed method is simple and rapid (5 min sample treatment); it is suitable for very small samples and does not alter the original form of the mercury species. Thus it is of special interest in those cases in which validation of the results may often be hampered by lack of sample availability.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Inorganic mercury (Hg^{2+}) and monomethylmercury (CH_3Hg^+) are the two most abundant Hg species generally found in biological samples [1]. Toxicity, biochemical behaviour and transport of mercury in the environment are clearly dependent on its chemical form [2]. In this context, it is well known that organomercurial compounds are more harmful than inorganic mercury. The fact that the latter is biomethylated by aquatic organisms to form methylmercury is the reason why fish constitutes the major source of MeHg for humans [3] (predatory species may preconcentrate 10,000–100,000 times the mercury concentration in water [4]). The most relevant aspects for bioaccumulation are fish size and/or fat content [5,6], the protein affinity mechanisms [7], and the content of dissolved oxygen in the fish habitat [8].

Mercury interacts with proteins and enzymes due to its strong affinity for sulphur, causing organ dysfunction and a devastating effect on the whole central nervous system of human [11]. In spite

that toxicity of EtHg is lower than that of MeHg, both species cause similar symptoms [9,10].

Extraction of mercury species from a complex sample is recognized as one of the most crucial steps before their determination. A successful extraction procedure for speciation analysis requires high extraction efficiency, and more importantly, all original species must keep intact prior to analysis [12]. Various extraction procedures, such as distillation and acid and alkaline extraction, have a tendency to form artificial methylmercury from inorganic mercury during sample preparation [13,14]. To avoid that acid and alkaline digestion or solvent extraction at moderate temperatures and pH are the methods commonly used to extract mercury species from biological tissues [15]. The high affinity of mercury to sulphhydryl groups makes L-cysteine and 2-mercaptoethanol two very useful reagents to extract mercury species in combination with ultrasounds. Several studies have shown that mercury extraction efficiency increases with increasing concentration of 2-mercaptoethanol [12]. Ultrasound-assisted extraction has already been shown as a very promising technique for the extraction of mercury species. In this way, Rio-Segade and Bendicho [16] developed an ultrasound-assisted extraction method using 2 and 4 mol L⁻¹ HCl for mercury speciation in fish tissues.

* Corresponding author. Tel.: +34 913945145; fax: +34 913944329.
E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

Furthermore, enzymatic hydrolysis has also been used due to the ability of enzymes to act on specific chemical bonds avoiding alteration of the chemical forms of mercury [17]. Rai et al. employed Protease XIV to extract inorganic mercury and methylmercury species from fish samples [14].

The main aim of this study is the evaluation of the extraction efficiency of both acid leaching and enzymatic hydrolysis (with and without 2-mercaptoethanol) assisted by ultrasounds for mercury determination and speciation in fish tissues samples. An ultrasonic probe has been selected as it drastically decreases the extraction time and has successfully been used for enzymatic hydrolysis of selenium species in a wide range of matrices [18]. The effect of several parameters affecting mercury extraction such as acid concentration, ultrasonic amplitude, sonication time, amount of extractant and sample size (50 and 5 mg) have been evaluated.

The optimized enzymatic hydrolysis with 2-mercaptoethanol have been applied to biological samples including mussels, swordfish and zebra fish embryos. The latter are particular relevant because as living organisms they are considered an excellent alternative model for the OECD 305 bioconcentration test, which is expensive, time consuming and requires the use of at least 108 juvenile or adult fish. These embryos have a similar genetic code to humans but they are not considered as laboratory animals by the Directive 86/609/EEC.

Finally, a chromatographic method for separation of mercury species coupled to ICP-MS have also been developed and validated using tuna fish tissue CRM-463 as reference material.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Samples for total mercury determination were digested in doubled-walled advanced composite vessels using a 1000 W MSP (microwave sample preparation system) microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA). A Vibra cell VCx130 ultrasonic processors (Connecticut, USA) equipped with a titanium 2-mm-diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 130 W at frequency of 20 KHz was used for extracting mercury species. An Eppendorf Centrifuge 5804 R (Hamburg, Germany) F34-6-38 was used for separation of solid residues from the soluble fraction.

A quadrupole ICP-MS Thermo X-Series (Thermo Electron, Windsford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fussell Torch, and an Impact Bead Quartz Spray Chamber cooled by a Peltier system was used for mercury determination. The mass calibration of the ICP-MS instrument was tuned daily with a solution containing $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of Li, Be, Co, Ni, In, Ba, Ce, Pb, Bi and U in 5% (v/v) HNO_3 .

The liquid chromatographic system used for mercury speciation consisted of a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) with a 100- μL injection loop and a reversed-phase analytical column (Symmetry Shield RP18 column, 150 mm \times 3.9 mm, 5 μm , Waters). The outlet of the column was directly connected to the nebulizer of an ICP-MS system using PEEK tubing (\varnothing = 0.13 mm). The optimal operation conditions and data acquisition parameters are summarized in Table 1.

2.2. Reagents and materials

All reagents used were of analytical grade. H_2O_2 (35%) from Panreac and HNO_3 (65%) from Merck were used for acid digestion of samples. Non-specific protease type XIV, 2-mercaptoethanol, lipase and L-cysteine monohydrochloric (98%) from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used for

Table 1
Operational parameters of the HPLC-ICP-MS system.

Plasma conditions	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L min ⁻¹
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Impact Bead Quartz Spray
Measurement parameters	
Acquisition mode	Time resolved analysis
Isotope monitored	²⁰² Hg, ²⁰¹ Hg and ²⁰⁰ Hg
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3
HPLC conditions	
Column	Symmetry Shield RP18 (150 \times 3.9 mm, 5 μm)
Injection volume	100 μL
Column temperature	25 $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase	0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 2% (v/v) methanol, 0.02% (w/v) L-cysteine (pH 2.1)
Elution mode	
Flow rate	1 L min ⁻¹

enzymatic hydrolysis. A 50 mM Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 from Fluka were used as extractant media. For acid leaching, HCl (37%) from Merck was used.

The carrier solution for total mercury analysis contained KCl from Riedel-de Haën, HCl and 2-mercaptoethanol.

Heptafluorobutyric acid, formic acid, L-cysteine mono hydrochloridric from Sigma and methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) were used in the chromatographic mobile phases.

Standard solutions were prepared daily by making appropriated dilutions of a methylmercury chloride stock standard solution of 1000 mg L⁻¹ (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in methanol (LC grade, Scharlau) with ultra-pure water (18.2 M Ω cm⁻¹) from a Milli-Q water purification system (Millipore, MA, USA). This solution was stored in the dark at -18°C .

2.3. Mercury speciation by HPLC-ICP-MS

The resulting supernatants from the procedures detailed in Fig. 1 were analyzed by FI-ICP-MS and LC-ICP-MS for determination of total mercury and its species, respectively. The extracts obtained were centrifuged at 7600 rpm for 5 min and the supernatants were filtered through a 0.22 μm membrane before LC-ICP-MS analysis.

Quantification was performed in time resolved analysis mode and the operating conditions of LC-ICP-MS are summarized in Table 1.

The most abundant mercury isotope ²⁰²Hg was used for data evaluation and the analytical precision was verified by replicate measurements (three injections of a single sample). Quantification was based on peak areas by standard addition method. The different extractions methods reported in this work were optimized using the certified reference material, tuna fish tissue CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ methylmercury), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR).

3. Results and discussion

3.1. Determination of mercury by ICP-MS: memory effect

Determination of total mercury in biological samples using a classic wet digestion method followed by ICP-MS suffered from serious memory effects [12]. Mercury accumulates within the sample introduction system and it is slowly released over time; thus increasing the response signals for the same mercury concentration. This fact results in non-linear calibration curve, need for

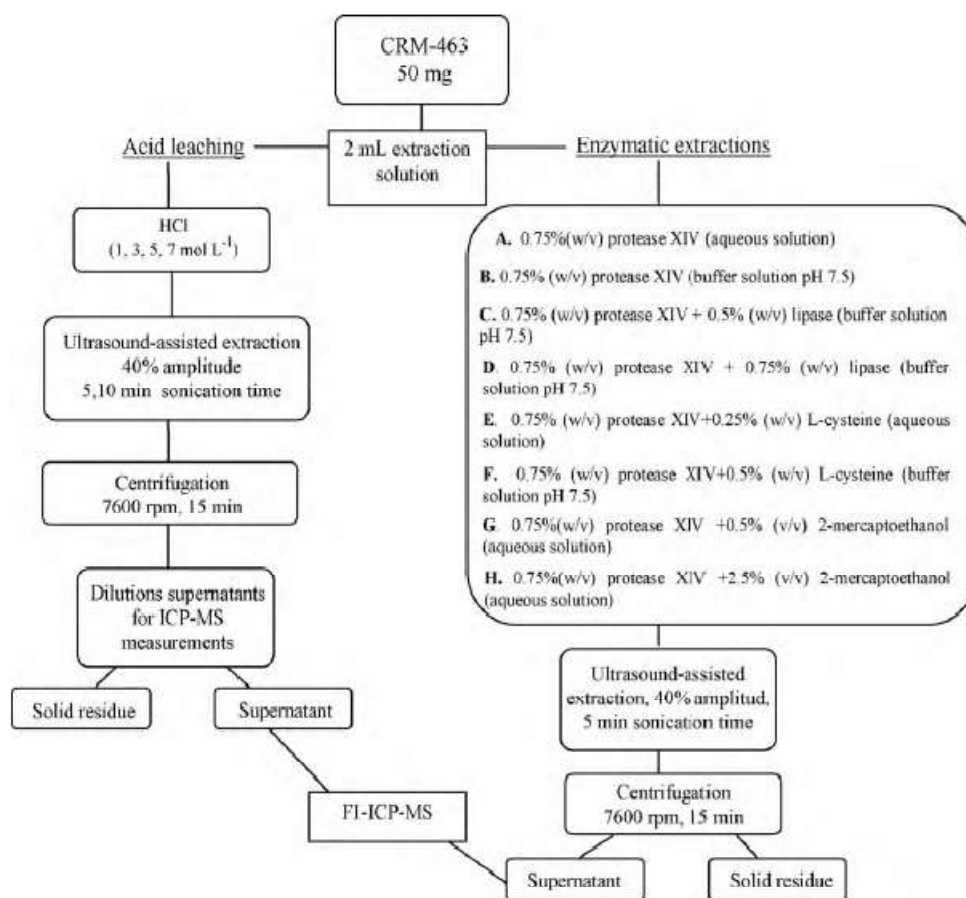


Fig. 1. Scheme showing the different extraction methods used for sample treatment.

long washing times and poor sensitivity [19]. Since the memory effect can be overcome by the addition of Hg(II) ligands [20], a carrier solution containing 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.15% (w/v) KCl was used with this purpose in the present study. HCl was added to the carrier solution in order to maintain the pH at approximately 2, since quantitative analysis of mercury species in biological matrices is favoured at acid medium [12].

3.2. Evaluation of the extraction efficiency

Several extraction procedures based on the use of ultrasonic probe sonication were compared. For this purpose, acid leaching and enzymatic hydrolysis with and without mercury complexing reagents (L-cysteine and 2-mercaptoethanol) were used. In order to optimize the acid leaching, several variables such as concentration of HCl, 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹, ultrasonic amplitude, 40 and 60%, and sonication time, 5 and 10 min, were investigated. In the case of enzymatic extractions several types of enzymes were tested using the optimal ultrasonic parameters found for acid leaching. Besides the extraction of mercury species with 15 mg of protease XIV, several amounts of lipase were added (0.5% (w/v) and 0.75% (w/v)), plus different extraction media such as phosphate buffer solution at pH 7.5 and Tris-HCl buffer solution at pH 7.5. Finally, two mercury complexing reagents, L-cysteine (0.25% (w/v) and 0.5% (w/v)) and 2-mercaptoethanol (0.5% (v/v) and 2.5% (v/v)) were tested to improve the extraction efficiency. Extraction procedures were optimised by using the tuna fish tissue CRM-463 certified for methylmercury. A summary of the different strategies employed is compiled in Fig. 1.

3.2.1. Acid leaching

Acid hydrolysis is one of the most popular methods for mercury extraction [17]. Releasing of protein-bound mercury species with hydrochloric acid has been shown as more efficient than nitric or acetic acid-based leaching [16]. In general, the extraction efficiency is essentially governed by acid concentration, sonication time and ultrasonic amplitude. Thus, four hydrochloric acid concentrations, 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹, were used for sonication during 5 and 10 min at 40 and 60% ultrasonic amplitude. As it has been commented before, optimization of the different parameters was performed using tuna fish tissue CRM-463.

Mercury recovery increases with increasing HCl concentration obtaining a maximum recovery of 99 ± 3% with 7 mol L⁻¹ hydrochloric acid (Fig. 2). These results could be due to the retention of mercury within fish tissue particles at HCl concentration lower than 7 mol L⁻¹. Regarding exposure time, shorter sonication periods have a favourable effect on mercury extraction. Recoveries were considerably lower at a longer exposure time (10 min) as compared to 5 min, which may be caused by volatilization of mercury species due to the creation of the oxidative energy during the sonication process. Thus, 5 min was chosen as optimal treatment time.

Extraction efficiency decreased with increasing amplitude from 40 to 60% (data not shown) because a high vibrational amplitude generates a great number of cavitation bubbles in the solution, which may dampen the passage of ultrasound energy through the liquid.

Based on these results, the optimal conditions found for quantitative extraction of mercury were 7 mol L⁻¹ hydrochloric acid and 5 min of sonication time at 40% ultrasonic amplitude.

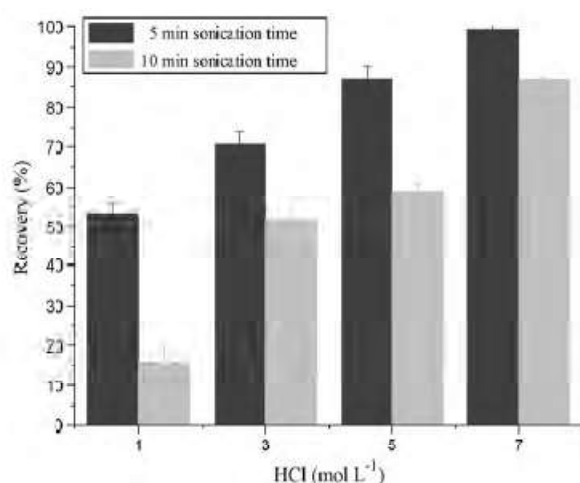


Fig. 2. Effect of hydrochloric acid concentration on the total mercury recovery for 50 mg of sample using 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹ HCl as extractant agent at two sonication times, 5 and 10 min.

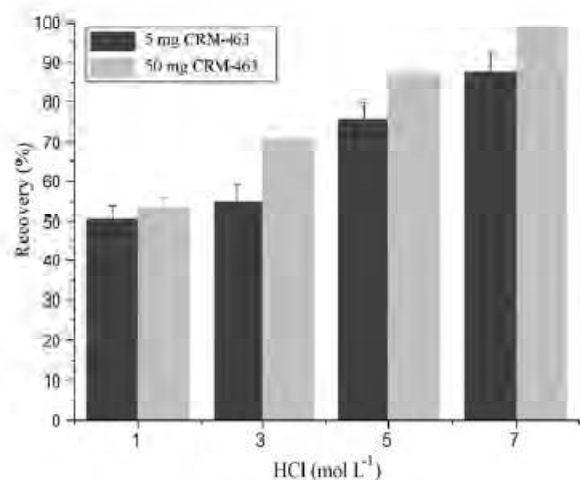


Fig. 3. Comparison of the effect of hydrochloric acid concentration on the total mercury recovery for 5 and 50 mg of sample using 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹ HCl as extractant agent and a sonication time of 5 min.

One of the advantages of ultrasonic probe sonication is its ability to handle small amounts of sample in volumes as low as microliters. For this purpose, the optimised extraction procedure was applied to 5 mg of tuna fish reference material and, as shown in Fig. 3, the mercury recovery from CRM-463 varying the HCl concentration was almost independent of the amount (5–50 mg) of sample used. The recovery of mercury and the precision of the results for 5 mg of samples, $88 \pm 5\%$, were lower than with 50 mg; however, this lower value could be considered satisfactory as it could be attributed to

a lack of homogeneity of CRM-463 when the amount of sample is too small.

3.2.2. Enzymatic extraction

Quantification of mercury by ICP-MS using HCl as extractant reagent suffers of several drawbacks: signal depression, changes in the viscosity of the aspirated solutions, variations on the nebulization efficiency and in aerosol transport [21]. Furthermore, the use of high concentration of HCl hampers the good performance of the ultrasounds tip. Thus, besides the almost quantitative recovery achieved with HCl, different enzymatic mixtures following the procedures detailed in Section 2 were applied. Table 2 shows the recoveries of mercury obtained using different enzymatic extraction assisted by ultrasounds. Recoveries for procedures A–D, only based on enzymatic hydrolysis with protease type XIV, did not reached 40%. In order to improve this value, the use of additional enzymes in the extraction medium, Hg complexing reagents and different conditions were tested: (1) use of lipase enzyme (procedures C and D), due to high lipid content of the fish samples, (2) use of buffer solutions at pH close to 7.5 (procedures C, D and F), for optimal enzyme activity [22] and (3) use of a sulphhydryl reagent (L-cysteine and 2-mercaptoethanol) because its high affinity for mercury. From the results, addition of lipase had a negative effect on the recovery and was not dependent of the amount added (Table 2).

Recovery achieved with the addition of 0.25% (w/v) L-cysteine in aqueous solution or 0.5% (w/v) L-cysteine in buffer solution at pH 7.5 as mercury complexing reagent (procedures E and F) was about 40%. This recovery could be improved by adding HCl to the extraction solution and heating. Hight and Cheng doubled the amount of mercury extracted with the use of heated HCl, until reaching quantitative extraction [23]. Other authors have achieved a quantitative extraction of mercury by using 0.10% (v/v) HCl, 0.05% (m/v) L-cysteine, 0.10% (v/v) 2-mercaptoethanol mixture [24,25], however, the extraction times needed were higher than the 5 min employed in the method developed in this work. The use of 2-mercaptoethanol had, as expected, a positive effect on the recovery. The efficiency increased with higher concentrations. The best recovery ($91 \pm 4\%$) was obtained when the extractant contained 2.5% (v/v) of 2-mercaptoethanol and 0.75% (w/v) of protease type XIV (procedure H). According to De Souza et al., a significant increase in mercury recoveries was observed when using 2-mercaptoethanol instead of L-cysteine [25]. No significant improvement in terms of efficiency was obtained neither by increasing 2-mercaptoethanol percentage (5% (v/v)), nor by applying a second hydrolysis to the solid residue. According to the data shown in Table 2, the most suitable methodology for total mercury extraction was the enzymatic extraction using 2.5% (v/v) of 2-mercaptoethanol and 0.75% (w/v) of protease type XIV. Thus, this procedure was selected for further applications to other fish tissue samples such as mussel and swordfish. To check the applicability of the method to microsample analysis, mercury extraction was carried out in zebra fish embryos (sample size about 2 mg),

Table 2
Extraction of total mercury from CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$) using different enzymatic hydrolysis and measured by FI-ICP-MS.

Type enzymatic extraction	Recovery, $\bar{x} \pm s^a$ (%)
A 0.75% (w/v) Protease type XIV (aqueous solution)	36 ± 2
B 0.75% (w/v) Protease type XIV (Buffer solution pH 7.5)	39 ± 13
C 0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (w/v) Lipase (buffer solution pH 7.5)	11.0 ± 0.2
D 0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.75% (w/v) Lipase (buffer solution pH 7.5)	5 ± 1
E 0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.25% (w/v) L-cysteine (aqueous solution)	40 ± 3
F 0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (w/v) L-cysteine (buffer solution pH 7.5)	41 ± 2
G 0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol (aqueous solution)	80 ± 1
H 0.75% (w/v) Protease type XIV + 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol (aqueous solution)	91 ± 4

^a Average value \pm standard deviation ($n=3$).

Table 3
Results of total mercury measurements by FI-ICP-MS.

Biological sample	Acid digestion, $\bar{x} \pm s^a$ (mg Hg kg ⁻¹ sample)	Enzymatic hydrolysis with 2- mercaptoethanol, $\bar{x} \pm s^a$ (mg Hg kg ⁻¹ sample)	Recovery [*] , $\bar{x} \pm s^a$ (%)
Mussel (50 mg)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.04	89 ± 6
Mussel (5 mg)		0.15 ± 0.02	81 ± 11
Swordfish (50 mg)	0.47 ± 0.01	0.39 ± 0.02	83 ± 4
Zebra fish (2 mg)	4.5 ± 0.6	4.0 ± 0.6	90 ± 10

^{*} Recovery of total mercury obtained after enzymatic hydrolysis as compared to acid digestion.

^a Average value ± standard deviation ($n=3$).

incubated with 200 µg L⁻¹ of methylmercury, and mussel tissue (sample size about 5 mg). The results obtained are shown in Table 3. The contents of mercury in samples (even microsamples) treated by enzymatic hydrolysis were in good agreement with those obtained by a classical acid digestion treatment. As expected, the precision of the results when using microsamples (a few mg) was lower, than that obtained when using higher amounts of sample.

3.3. Mercury speciation by HPLC-ICP-MS

The results showed before demonstrate the suitability of using of ultrasonic probe sonication (2 mm microtip) for the rapid and efficient extraction of mercury from fish tissues of different nature and sample size. However, since species interconversion caused by ultrasonication has been reported for several authors [26], the extracts resulting from enzymatic hydrolysis with 2-

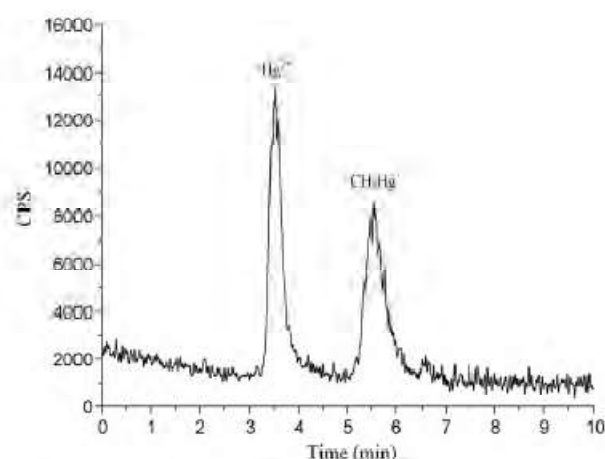


Fig. 4. Chromatogram obtained for 50 µg L⁻¹ of Hg^{2+} and MeHg^+ standards using reverse phase chromatography and ICP-MS.

mercaptoethanol were analysed by LC-ICP-MS. Based on previous works published in the literature [27], the chromatographic column selected was a reverse phase column (Symmetry Shield RP18, 150 mm × 3.9 mm, 5 µm) and the mobile phase used contained 0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 0.02% (w/v) L-cysteine and 2% (v/v) methanol. The addition of 0.02% (w/v) L-cysteine to the mobile phase was found to be critical in preventing retention of mercury in the reverse phase column and long tailing in the ICP-MS [28] chromatographic peaks. As it can be seen in the elution profiles of methylmercury and inorganic mercury standards shown in Fig. 4 (using separation conditions given

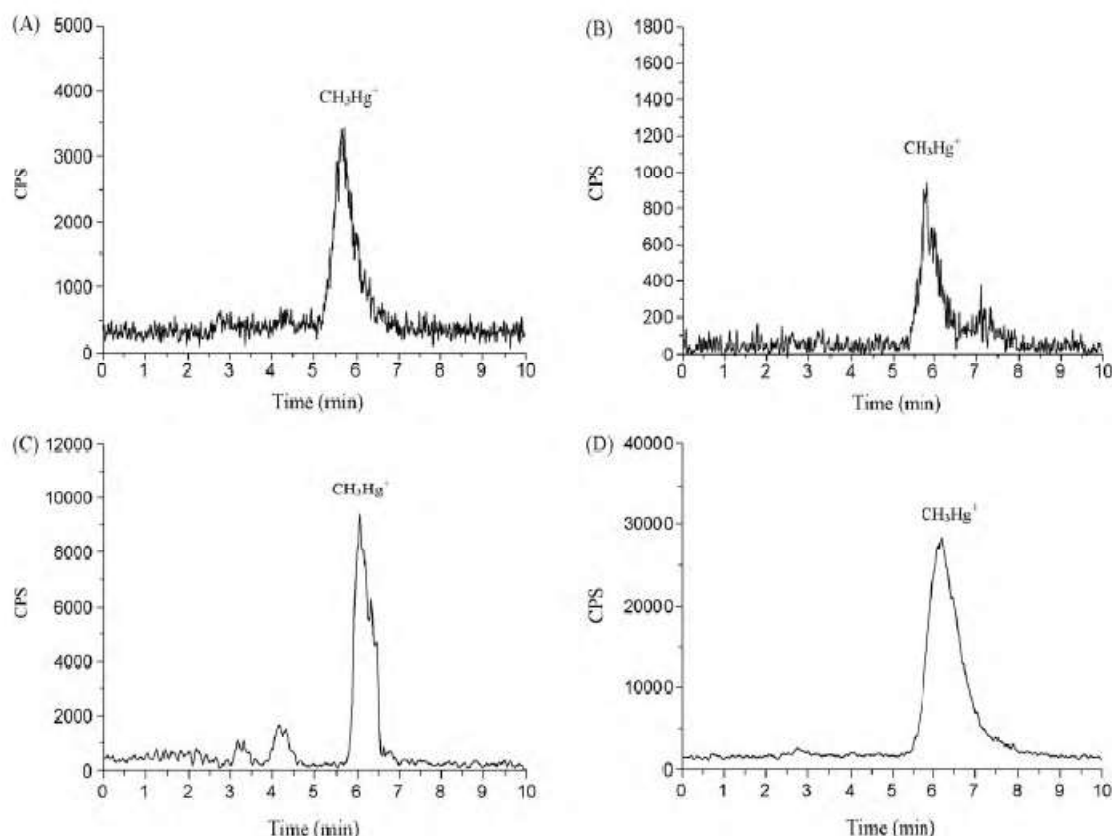


Fig. 5. Chromatograms of mercury species found in (A) tuna fish CRM-463, (B) mussel, (C) swordfish tissue, and (D) zebra fish embryos using reverse phase chromatography coupled to ICP-MS.

in Table 1), separation of Hg species is very fast; it only takes around 7 min.

Chromatographic analyses were performed on enzymatic extracts of tuna fish CRM-463, mussel and swordfish tissue and zebra fish embryos. The chromatograms obtained (Fig. 5(A)–(D)) showed a single peak in each of the evaluated sample, which was identified (by spiking the extract) as MeHg⁺.

The chromatographic profile of the CRM-463 revealed that interconversion of methylmercury did not occur during ultrasound-assisted extraction of mercury species. As expected, the main mercury specie found in all the analyzed samples was MeHg⁺, which is in good agreement with the studies reported by Cabañero et al. [29]. This may be explained due to the MeHg biomagnification phenomena through the trophic chain and the high affinity of fish intestine wall toward MeHg absorption [30]. Moreover, the selected methods allow extraction of mercury species in a few minutes from small size samples.

4. Conclusions

Quantitative extraction of mercury has been achieved using enzymatic extraction (15 mg protease XIV) plus 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol as complexing agent for mercury combined with the use of a titanium ultrasonic probe of 2 mm. The developed method is simple and rapid (10 min sample treatment), and no transformations between mercury species were detected. One novelty of the procedure is its ability to be applied to small size samples, which is significantly relevant for those cases in which big amounts of samples are not available or when they are highly valuable.

Acknowledgments

The authors want to thank the Spanish Government for financial support through the projects: CTQ-2008-05925 and CTQ2008-01031-BQU and Ministerio de Medio Ambiente 046/PC08/2-14.4. I. López thanks the Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and the European Social Fund for funding through the programme “Contrato de Personal de Investigación de Apoyo” (Project S-0505/AGR/0312). S. Cuello thanks to

Ministerio de Ciencia e Innovación for the FPU predoctoral fellowship.

References

- [1] M. Leemakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 383.
- [2] W. Baeyens, *Trends Anal. Chem.* 11 (1992) 245.
- [3] D.S. Forsyth, V. Casey, R.W. Dabeka, A. McKenzie, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 849.
- [4] World Health Organization, Geneva, *Environmental Health Criteria, Methylmercury*, 101, ICPS (1990).
- [5] P. Larsens, M. Leemakers, W. Naeyens, *Waters Air Soil Pollut.* 56 (1991) 103.
- [6] T.M. Grieb, C.T. Briscoll, S.P. Gloss, C.L. Schofield, G.L. Bowie, D.B. Pordello, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 919.
- [7] N.S. Bloom, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 (1992) 1010.
- [8] R.P. Mason, W.F. Fitzgerald, *Nature* 347 (1990) 457.
- [9] K. Eto, *Toxicol. Pathol.* 25 (1997) 614.
- [10] J.R. Peralta-Videa, M.L. Lopez, M. Narayan, G. Saupé-Torres, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1665.
- [11] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 98.
- [12] W. Meng, F. Weiye, S. Junwen, Z. Fang, W. Bing, Z. Motao, L. Bai, Z. Yuliang, C. Zhifang, *Talanta* 71 (2007) 2034.
- [13] H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilgen, R.D. Evans, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363.
- [14] A.J. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1595.
- [15] R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (2002) 1560.
- [16] S. Rio-Segade, C. Bendicho, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 263.
- [17] L.H. Reyes, G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123.
- [18] Z. Pedrero, Y. Madrid, H. Hartikainen, C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 266.
- [19] C.F. Harrington, S.A. Merson, T.M.D. DiSilva, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 247.
- [20] X. Zhu, S.D. Alexandratos, *Microchem. J.* 86 (2007) 37.
- [21] L. Jian, W. Goessler, K.J. Irgolic, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 48.
- [22] G. Vale, R. Rial-Otero, A. Mota, L. Fonseca, J.L. Capelo, *Talanta* 75 (2008) 872.
- [23] S.C. Hight, J. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160.
- [24] J.L. Rodrigues, S.S. de Souza, V.C. de Oliveira Souza, F. Barbosa, *Talanta* 80 (2010) 1158.
- [25] S.S. De Souza, J.L. Rodrigues, V.C. de Oliveira Souza, F. Barbosa, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 79.
- [26] Z. Pedrero, J. Ruiz-Encinar, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 1061.
- [27] L. Yu-Feng, C. Chuying, L. Bai, W. Qing, W. Jiangxue, G. Yuxi, Z. Yuliang, C. Zhifang, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 925.
- [28] W. Chem, P. Wee, I.D. Brindle, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 409.
- [29] A.J. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoréu, C. Cámara, *Biol. Trace Elem. Res.* 103 (2005) 17.
- [30] F.M. Morel, A.M.L. Kraepiel, M. Amyot, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29 (1998) 543.

**BIOACUMULACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE METILMERCURIO Y SELENITO USANDO
LARVAS DE PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*) LARVAE AS A MODEL**

S. Cuello, J. Sanz-Landaluce, J. Guinea, Y. Madrid, C. Cámara,

“Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish
(*Danio Rerio*) larvae as a model”

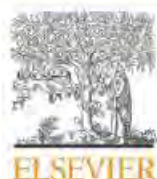
Talanta, 2012, 89, 169-177

Este trabajo fue presentado como comunicación en:

“XXI Reunión Nacional de Espectroscopía. V Congreso Ibérico de Espectroscopía”,
Murcia, España, Septiembre, 2008.

Parte de este trabajo fue presentado como conferencia plenaria en:

“15º Encontro Nacional de Química Analítica. 3º Congresso Iberoamericano de
Química Analítica”, Salvador de Bahía, Brasil, Octubre, 2009.



Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model

S. Cuello^a, J. Sanz-Landaluze^{a,*}, Y. Madrid^a, J. Guinea^b, C. Cámara^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Zf BioLabs, Ronda de Valdecarrizo 41^a B, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2011

Received in revised form

30 November 2011

Accepted 4 December 2011

Available online 24 December 2011

Keywords:

Bioconcentration

Zebrafish larvae

Methylmercury

Selenite

Metabolism

ABSTRACT

Bioaccumulation and possible transformation of methylmercury and selenite has been checked on a 72 h-cycle of bioaccumulation and depuration using larvae from zebrafish. The larvae were exposed to methylmercury and selenite at concentrations of 1% and 0.1% of their LC₅₀ values. Quantitative extraction of methylmercury and selenite from exposed larvae was achieved by using ultrasonic probe-assisted extraction (USP), thus reducing extraction time and solvent consumption. Extracted species collected at different exposure times were characterized and quantified by liquid chromatography coupled to ICP-MS. Bioconcentration factors (BCFs) were estimated by two procedures: (i) as the ratio of the contaminant concentration in larvae and exposure media (BCF_{48h}) and (ii) fitting contaminant concentration in larvae to bioaccumulation models that describe uptake and depuration processes (BCF_k). The BCFs obtained for methylmercury were 5000 and 2333 for larvae exposed to 1 µg L⁻¹ and 10 µg L⁻¹, respectively; while for selenite the BCF was 74 for larvae exposed to 10 µg L⁻¹. The good correlation between the BCFs found and those previously reported in the literature shows the proposed method as a good and promising alternative to the OECD Bioconcentration Test 305. Actually, the use of zebrafish larvae reduces the bioaccumulation test time from forty two (OECD Bioconcentration Test 305) to three days. In addition, potential biotransformation of both methylmercury and selenite was evaluated by LC-ICP-MS. For this purpose, a method for species extraction in small size samples by using ultrasonic probe sonication was developed.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

REACH is the European Community Regulation (EC 1907/2006) [1] on chemicals and their safe usage, which main objective is to improve the protection of human health and environment by identification of the intrinsic properties of chemical substances. This regulation states that those chemicals whose production exceeds 10 tons per year and also those regarded as PBTs (Persistent, Bioaccumulable and Toxic) substances require a chemical safety report where information about its physical, chemical and health and safety data should be detailed. Besides chemical properties, studies about the ecotoxicity, mobility, persistence, bioaccumulation, and degradation of the contaminants are also required. REACH's Test Methods Regulation for bioaccumulation factor calculation [2] have established OECD Bioconcentration Test 305 [3] as the standard method, although other tests such as the ASTM E1022-94 from

the American Society for Testing and Materials and OPPTS 850.1730 from US EPA are also considered as valid. The OECD Test Guideline describes a procedure for characterizing the bioconcentration factors of chemicals in fish based on the measurement of chemical content in both fish tissue and exposure solution at increasing exposure time until a steady response is reached (42 days). The long term study along with the high number of determinations required (at least 108 juvenile or adult fish specimens) results on a very expensive test (more than 100,000\$ per compound studied) [4].

To overcome the mentioned drawbacks, REACH European legislation has proposed to replace animal testing wherever possible and to use animal-free approaches [5,6]. Among them zebrafish larvae has been considered as an excellent alternative model for toxicological assessment and bioaccumulation studies because it represents the complex dynamic, interactive and multi-organ events that occur *in vivo* in the context of a complete organism but with the additional benefit that is not considered as a laboratory animal according to the Directive 2010/63/EU. Other additional advantages are high reproductive capabilities (each female is capable of laying 200–300 eggs per week), a fast embryonic

* Corresponding authors. Tel.: +34 913944368; fax: +34 913944329.
E-mail address: jsanzlan@quim.ucm.es (J. Sanz-Landaluze).

development and a genome similar to that of humans (over 80% similarity), thus facilitating extrapolation of the obtained results to humans. However, application of zebrafish larvae approach is not straightforward and requires first an adaptation of the protocol taking into account the following criteria [7]: (i) the substances and fish species used must be clearly specified in the protocol, (ii) test substance measurement should be performed in both fish tissue and exposure medium and (iii) BCFs values should always reflect steady state conditions.

Further, the determination of chemical concentration in larvae for BCF determination is still a challenge since it requires highly sensitive analytical techniques because only a small amount of substance might get accumulated due to the small volume of fish larvae.

Mercury is a well-known pollutant that can cause evolutionary changes due to their harmful effects on living organism. Mercury toxicity is highly dependent on its chemical form, being, organomercurial compounds more harmful than inorganic mercury. Due to its high lipophilicity [8], methylmercury accumulates throughout the food chain. Moreover, methylmercury can cross the blood–brain barrier causing damages in the brain and neurological disorders. Most of the knowledge on the toxic effects of methylmercury has come from catastrophic episodes of poisoning (Minamata and Niigata, Japan 1950s) [9,10].

Selenium is an essential trace element because it acts as a cofactor in several enzymes [11–13]. This element also has toxic properties, and there are evidences that can be responsible on reproductive failure in fish [13]. Selenium from both natural and anthropogenic sources enters surface waters primarily as the highly soluble Se(IV) and Se(VI) oxidation states. Organics selenides (Se(–II)), including selenoamino acids and selenoproteins, methyl selenides, and other Se-substituted analogs of organosulfurs compounds, are produced by biological reduction of selenite [14].

Selenium and mercury species determination in biological samples is not an easy task because of the low selenium and mercury concentration levels. Selenium and mercury speciation is commonly performed by HPLC or GC coupled to ICP-MS. Extraction of mercury and selenium species from a complex sample is recognized as one of the most crucial steps before their determination. A successful extraction procedure for speciation analysis requires high extraction efficiency while maintaining intact the original species distribution [15]. Ultrasound-assisted extraction has already been shown as a very promising technique for extraction of selenium and mercury species [16–18], however, very few have been reported about its application in zebrafish larvae. Selenium and mercury determination and speciation in zebrafish larvae is still a challenge because of its small size and high fat content.

Therefore, the aim of this work is to calculate the BCFs of methylmercury and selenite in zebrafish larvae, and checking the possible transformation of the species tested due to zebrafish larvae metabolism. The idea behind is to evaluate the potential of using zebrafish as an alternative to the high-time consuming and expensive models using adult fish. For this purpose, an analytical methodology based on the use of LC-ICP-MS and the application of several sample treatments have been developed for mercury and selenium species determination in zebrafish larvae.

2. Material and methods

2.1. Instrumentation

A Vibra cell VC130 ultrasonic processor (CT, USA) equipped with a titanium 2-mm-diameter microtip and fitted with

a high-frequency generator of 130 W at 20 kHz was used for leaching the analytes from larvae samples. Centrifugation was carried out in a centrifuge model type: Centrifuge 5415-R (Eppendorf, Germany). A quadrupole ICP-MS Thermo X-Series equipped with a meinhart nebulizer, a fusel torch, and impact bead quartz spray chamber cooled by a peltier system was used for selenium and mercury determination. The mass calibration of the ICP-MS instrument was tuned daily with a solution containing $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of Li, Co, Y, Ce, and Tl.

The liquid chromatographic system used for mercury and selenium speciation consisted of a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokyo, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i; Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) with a 100 or 20- μL injection loop. The outlet of the column was directly connected to the nebulizer of an ICP-MS system using PEEK tubing ($\varnothing = 0.13 \text{ mm}$). The optimal operation conditions and data acquisition parameters are summarized in Table 1.

2.2. Reagents and standards

All reagents used were of analytical grade. H_2O_2 (Panreac, Madrid, Spain) and HNO_3 (Merck, Darmstadt, Germany) were used for acid digestion of samples. Non-specific protease type XIV (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) and HCl (Merck) were used for enzymatic hydrolysis and acid leaching, respectively. The carrier solution for flow injection (FI) mercury determination contained KCl (Riedel-de Haën AG, Berlin, Germany), HCl and 2-mercaptoethanol (Merck). The carrier solution for selenium determination was 2% (v/v) HNO_3 . Heptafluorobutyric acid (HFBA), trifluoroacetic acid (TFA), formic acid, L-cysteine mono hydrochlorhydric from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain) and methanol from Scharlau (Barcelona, Spain) were used in the chromatographic mobile phases.

All solutions and samples were prepared using high-purity water with a resistivity of $18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtained from a Millipore (Bedford, MA, USA) ZMFQ 23004 Milli-Q water system. Inorganic selenium solution was obtained by dissolving sodium selenite (CAS no.: 10102-18-8, Merck) in deionized Milli-Q water. Stock solutions of 1000 mg L^{-1} were stored in the dark at 4°C and working standard solutions were prepared daily by dilution. Methylmercury solution was obtained by dissolving methylmercury chloride (CAS no.: 115-09-3, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in methanol. This solution was stored in the dark at -18°C .

2.3. Larvae contamination

Zebrafish larvae were supplied from ZF BioLabs (Madrid, Spain). Exposure solution was prepared in a way that had a similar composition as fresh river water. Briefly, 16 mL of concentrated solution (containing 2.9 g of CaCl_2 , 17.2 g of NaCl, 0.76 g of KCl and 4.9 g of MgSO_4 per litre) were diluted to 1 L with distilled water. The final conditions of resulting exposure solution were: temperature $26 \pm 2^\circ\text{C}$, dissolved oxygen $\geq 60\%$ and pH 6–8.5 (before and after renewal), values that fulfil the requirements of OECD guideline. To get the zebrafish larvae, it was necessary to develop the embryos to 72 h post fertilization (hpf), development stage that represents the moment when the embryos hatched. Zebrafish larvae remain classified as such until another 48 h later (120 hpf) when they are regarded as proper fish, but can be considered non-feeding other 24 h [19]. Bioaccumulation experiments were performed in three tanks, one as control (without the addition of the analyte) and two containing the target analytes at different concentration levels.

Bioaccumulation experiments were performed in two phases [3]: exposure (uptake) and post-exposure (depuration). For this,

Table 1
Operational parameter of the ICP-MS and HPLC-ICP-MS systems.

Plasma conditions	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L min ⁻¹
Nebulizer	Concentric
Spray chamber	Double-pass spray chamber
Measurement parameters (mercury)	
Acquisition mode	Time resolved analysis
Isotope monitored	²⁰² Hg, ²⁰¹ Hg and ²⁰⁰ Hg
Dwell time per point	100 ms
Replicates	3
Measurement parameters (selenium)	
Acquisition mode	Time resolved analysis
Isotope monitored	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se (reaction cell with H ₂)
Dwell time per point	100 ms
Replicates	3
HPLC conditions (1) (mercury speciation)	
Column	Symmetry shield RP 18 (150 × 3.9 mm, 5 μm)
Injection volume	100 μL
Column temperature	25 °C
Mobile phase	0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) heptafluorobutyric acid, 2% (v/v) methanol, 10 mM L-cysteine
Elution	Isocratic
Flow rate	1 mL min ⁻¹
HPLC conditions (2) (selenium speciation)	
Column	Luna C18(2)-HST (100 × 2 mm, 2.5 μm)
Injection volume	20 μL
Column temperature	25 °C
Mobile phase	0.1% (v/v) heptafluorobutyric acid, 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid, 2% (v/v) MeOH
Elution	Isocratic
Flow rate	0.2 mL min ⁻¹
HPLC conditions (3) (selenium speciation)	
Column	Synergi-Fusion (100 × 2 mm, 2.5 μm)
Injection volume	20 μL
Column temperature	25 °C
Mobile phase	0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) heptafluorobutyric acid, 2% (v/v) methanol, 1 mM L-cysteine
Elution	Isocratic
Flow rate	0.2 mL min ⁻¹

zebrafish larvae were first exposed during 48 h to the chemical (selenite or methylmercury) (exposure phase) and subsequently exposed during 24 h to the medium (depuration phase). About 20–25 larvae and several milliliters of the corresponding exposure solution were taken from the tanks after 2, 4, 6, 24, 28, 45, 48, 50, 69 and 72 h of exposure and the concentration of the target analyte were determined in both larvae and exposure media. The sampling times were selected according to our experimental results previously reported. Following OECD recommendation, the loading rate of larvae at the beginning of the experiments ranged between 0.1 and 1.0 g L⁻¹ (wet weight) and the mortality of larvae was kept below 10% at the end of the test.

The nominal concentrations of the test substance were selected according to the requirements given by the OECD test 305, with the highest concentration being 1% of the LC₅₀ value and second exposure concentration differing from the first by a factor of ten. LC₅₀ values were selected according to the information appearing in the literature. For instance, METI-NITE Japan database has reported a LC₅₀ value of 8.6 mg L⁻¹ for selenite [20]. On the other hand, a LC₅₀ value of 250 μg L⁻¹ for methylmercury was obtained experimentally by ZF BioLabs (following the revised OECD protocol 403) [21]. Based on the above, nominal concentrations of 10 and 1 μg L⁻¹ for selenite and methylmercury respectively, were chosen to carry out the bioconcentration experiments. Although a concentration of 10 μg L⁻¹ of methylmercury does not fulfil recommendations given by OECD test (1% of the LC₅₀, 2.5 μg L⁻¹), however it was chosen since this species could not be quantified at lowest

concentration which, as OECD 305 test establish, should be 10 times lower (0.2 μg L⁻¹).

2.4. Analytical procedure

2.4.1. Determination of total selenium and mercury concentration in exposure media by ICP-MS

Determination of methylmercury on exposure solutions was carried out by a flow injection (FI) system coupled to the ICP-MS using a carrier solution containing 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.15% (w/v) KCl in order to reduce mercury memory effects [22]. The same flow injection (FI) system coupled to the ICP-MS was employed for selenium determination but using 2% (v/v) HNO₃ as carrier solution instead [23]. The optimal operation conditions for ICP-MS determination are summarized in Table 1.

2.4.2. Determination of mercury and selenium species in zebrafish larvae by LC-ICP-MS

Prior to the determination of mercury and selenium species content in larvae, an extraction step was required. In case of mercury, two different extraction procedures (acid leaching and enzymatic hydrolysis), previously developed by our group [16] were applied with a few modifications. Briefly, in the acid leaching a pool of 20 larvae (12 mg) were sonicated with 150 μL of 7 mol L⁻¹ HCl during 40 s at 40% ultrasonic amplitude and then diluted up to 800 μL with ultrapure water. For enzymatic hydrolysis, a pool of 20 larvae (12 mg) were sonicated with 7 mg of protease XIV during 40 s at 40% ultrasonic amplitude and then diluted up to 800 μL with ultrapure

Table 2

Selenium extraction yields from larva zebrafish compared with total extraction performed with MW-acid digestion.

Sample treatment		Recovery, $\bar{X} \pm S.D.^a$
A	Ultrasonic probe 40 seg 40% ultrasound amplitude + water	49 \pm 1
B	Ultrasonic probe 40 seg 40% ultrasound amplitude + protease XIV	47 \pm 3
C	Ultrasonic probe 40 seg 40% ultrasound amplitude + double extraction + water	69 \pm 1
D	Ultrasonic probe 80 seg 40% ultrasound amplitude + double extraction + water	77 \pm 2

^a Average value \pm standard deviation ($n=3$).

water. After extraction, 70 μ L of methanol was added to precipitate the lipidic content of the samples and samples were filtered by 0.22 μ m membrane filter before injection onto HPLC. Speciation of mercury species was carried out by reversed-phase chromatography coupled with ICP-MS using the conditions summarized in Table 1.

Selenium species extraction from larvae was performed by using different treatments based on the application of ultrasonic probe in an aqueous media (Table 2). The results obtained were compared with those provided after applying microwave acid digestion (total content of selenium). For that, a pool of 20 larvae (12 mg) were placed in a Teflon reactor and 200 μ L and 100 μ L of concentrated HNO_3 and H_2O_2 respectively were added and maintained for 4 h at 80 °C. Finally, samples were diluted to a total volume of 900 μ L and total selenium concentration was determined following the conditions summarized in Table 1. Selenium speciation was carried out by using reversed-phase chromatography coupled with ICP-MS using two different chromatographic columns for a better confirmation of species identity (Table 1). Samples were filtered by 0.22 μ m membrane filter before injection onto HPLC.

2.5. Quality assurance

Quality assurance steps included blanks, replicate analyses, certified reference material recoveries and calibrations. Linearity, drift check and spike recovery analyses were carried out using proper zebrafish larvae. Analyses were carried out by triplicate. Extraction procedures were optimized using the tuna fish tissue CRM-463 certified for methylmercury (obtained from Community Bureau of Reference, BCR (now renamed Standards, Measurements and Testing Programme)) [16] and a marine tissue reference material (Murst-ISS-A2, Antarctic Krill, from Italian Istituto Superiore di Sanità), certified for total selenium.

3. Results and discussion

3.1. Quality assurance

The limits of detection for the complete method (MDLs) for mercury and selenium were 0.01 μ g g⁻¹ and 0.03 μ g g⁻¹ for larvae respectively, and 0.1 μ g L⁻¹ and 0.2 μ g L⁻¹ for exposure solution, respectively. Concentrations of all target compounds in blanks were below MDLs. A good reproducibility (4–7% for exposure solutions and 6–15% for larvae) was found for three replicates of each analysis. Calibrations showed good linearity ($R=0.99$). Optimization using the certified materials show quantitative extraction for both methods used for methylmercury extraction: 99 \pm 3% for acid leaching and 91 \pm 4% for USP extraction. For total selenium the recovery achieved was 98 \pm 4%.

3.2. Exposure of larvae to methylmercury

3.2.1. Determination of methylmercury in exposure media and zebrafish larvae

According to the conditions given by the OECD test 305, a proper estimation of the bioaccumulation factor requires that

chemical concentration should not fluctuate more than 20% of the mean of the measured values during the uptake. To achieve this, methylmercury concentration in the exposure solution was maintained constant along the uptake phase (6.7 \pm 0.8 μ g L⁻¹ and 0.3 \pm 0.1 μ g L⁻¹ for the highest and lowest concentration, respectively, Fig. 1). Variation of experimental data obtained for the lowest concentration is higher than the limit established by OECD 305 requirements (32% of variation versus an allowed limit of 20%). It is important to highlight that the strict control of such low concentration (lower than 0.5 ppb) on an exposure media containing living organisms is difficult to achieve. This statement has been confirmed from experimental data on bioconcentration and bioaccumulation studies published [20]. Due to the lack of experimental data of concentration of the exposure media along the uptake period, our experimental results were very useful for further calculations. Methylmercury content in the exposure solution during depuration was either not detected or always below detection limits.

As it is shown in Fig. 2 no significant differences were observed between the methylmercury accumulation curves obtained at the two levels of methylmercury exposure, 10 and 1 μ g L⁻¹. The concentration of methylmercury increased during the uptake phase reaching a maximum value at 48–50 h of exposure. However, methylmercury was not significantly eliminated from larvae during the depuration step which could be justified for its high affinity to fatty tissues and the sulfhydryl groups of proteins. This slow

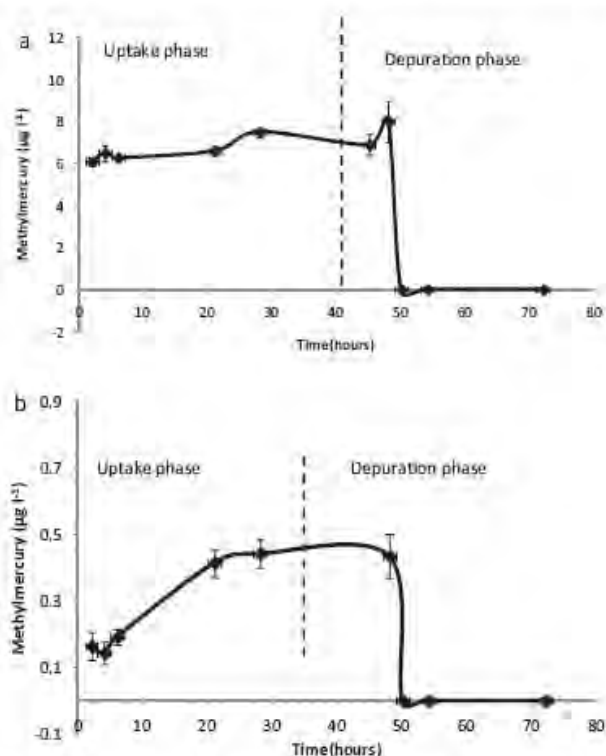


Fig. 1. Methylmercury concentration (μ g L⁻¹) in the culture medium. (a) Nominal content of 10 μ g L⁻¹ and (b) nominal content of 1 μ g L⁻¹.

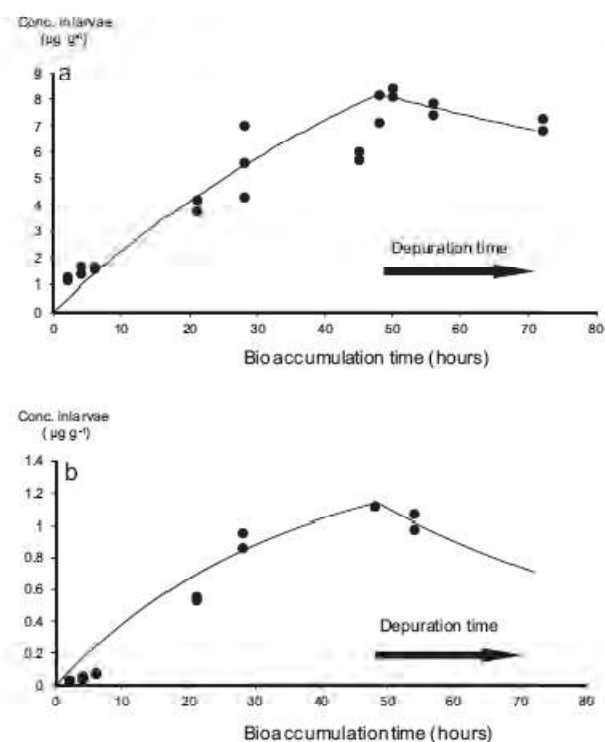


Fig. 2. Accumulation of methylmercury (mg g^{-1}) in larvae exposed to (a) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and (b) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of methylmercury. Solid circles (●) represent the experimental points and lines (—) the expected values based on the model calculations.

excretion of methylmercury has been also observed by other authors [8,24–26].

Potential biotransformation of methylmercury in larvae during accumulation was evaluated by speciation analysis. Acid leaching and enzymatic hydrolysis were applied for mercury species extraction before their identification and quantification by reversed-phase chromatography coupled with ICP-MS. The chromatograms obtained using both sample treatments (Fig. 3) showed only a single peak which was identified by retention time and spiking experiments as methylmercury, concluding that zebrafish larvae do not biotransform methylmercury during the uptake process.

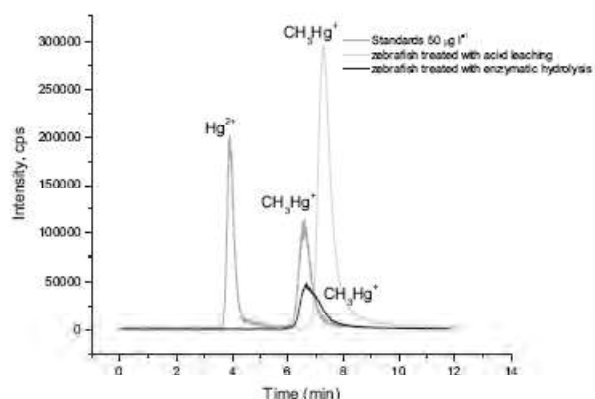


Fig. 3. Chromatographic profile obtained by reverse-phase LC-ICP-MS corresponding to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} and MeHg^+ , zebrafish treated with acid leaching and zebrafish treated with enzymatic hydrolysis. Chromatographic column: Symmetry Shield RP 18.

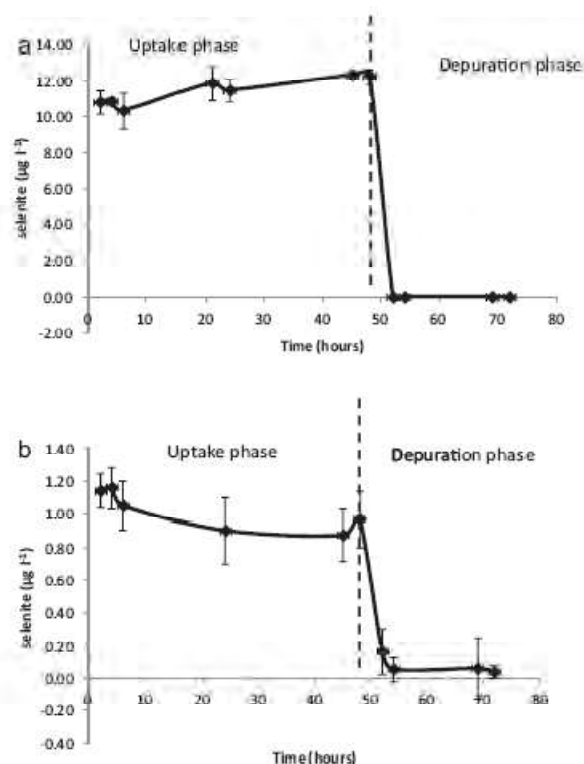


Fig. 4. Selenium concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) in the culture medium. (a) Nominal content of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and (b) nominal content of $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

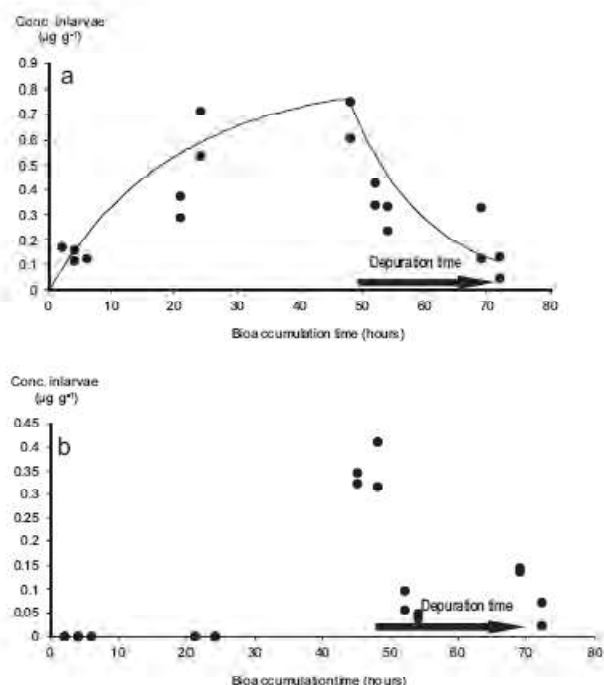


Fig. 5. Accumulation of selenite (mg g^{-1}) in larvae exposed to (a) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and (b) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of selenite. Solid circles (●) represent the experimental points and lines (—) the expected values based on the model calculations.

Table 3
BCFs and k_1 and k_2 values for larvae exposed to different concentrations of methylmercury and selenite.

	Uptake phase			Depuration phase	
	k_1 (L kg ⁻¹ h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	BCF _k	BCF _{48h}	k_2 (h ⁻¹)
Conc. MeHg (μg L ⁻¹)					
10	35	0.015	2333	1119	0.008
1	150	0.03	5000	3748	0.02
Conc. Se(IV) (μg L ⁻¹)					
10	3.7	0.05	74	67	0.08
1	–	–	–	354	–

3.2.2. Calculation of bioconcentration factors

Bioconcentration factor (BCF), the most employed parameter to assess the mobility of a contaminant from surrounding media to living organisms [27], is defined by the OECD test 305 as the ratio of a chemical concentration of the studied substance in an organism to the concentration in water once the equilibrium is reached [28]. The kinetics of the bioconcentration process can be described by a first order two-compartment (water and aquatic organism) model [29,30]. So, if the chemical concentration in water (C_w) is kept constant during the exposure period, the variation of a persistent chemical concentration on fish could be described by Eq. (1).

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

where k_1 is the uptake rate constant (L kg⁻¹ h⁻¹), k_2 is the elimination or depuration rate constant (h⁻¹), C_w is concentration of exposure media (expressed in mg L⁻¹) and C_f is the chemical concentration in fish (expressed in mg kg⁻¹ wet weight). When the equilibrium is reached (steady-state), Eq. (1) may be simplified as follows:

$$\frac{C_f}{C_w} = BCF_k = \frac{k_1}{k_2} \quad (2)$$

The elimination or depuration of chemicals from aquatic and terrestrial organism often follows a first order kinetics that can be described by Eq. (3).

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad (3)$$

where $C_{f,0}$ is the concentration at the start of the depuration period and as in Eq. (1), k_2 is the elimination or depuration rate constant (h⁻¹).

So, BCFs values for methylmercury were calculated by using two procedures (Table 3): (1) ratio between the concentration of methylmercury in larvae and exposure media at the maximum time of uptake phase (48 h) (BCF_{48h}) and (2) by applying Eq. (1) (BCF_k). For the later method, methylmercury concentration in larvae was displayed versus uptake time and data were fitted to a non-linear regression curve using the software OriginPro v.8.5 (from Origin-Lab, Northampton, MA, USA). Data obtained in the depuration phase were fitted to Eq. (3). Thus k_1 and k_2 values were obtained and finally the BCF_k was deduced from Equation (2).

Different values of BCF_k and BCF_{48h} were obtained for methylmercury, but not for selenium (Table 3) due to the fact that a steady-state during the uptake phase was not reached. Organometallic compounds with high octanol/water partition coefficient (K_{ow}) values could require longer exposure time than the 48 h used to reach a steady state. BCF_k values, calculated under these conditions using the adjustment to the kinetic model, are considered quite accurate and will be used forward to compare our experimental data with those found in the literature. The BCF_k values experimentally obtained in the present study are in good agreement with those BCFs compiled in the ECOTOX database [31],

which are within the range of 1113–5900 for a 1 μg L⁻¹ exposure and with other data obtained (3344 for a concentration of 1 μg L⁻¹ and within the range of 595–3000 for a concentration of 10 μg L⁻¹) from experiments with medaka fishes (*Oryzias latipes*) [24].

Bioconcentration factor has been often related with K_{ow} because of the link between K_{ow} and cell membrane permeability [29]. In general, the bioconcentration factors of chemicals increases as K_{ow} values increase. Table 4 lists the regression values obtained for BCF estimation from K_{ow} values [30,32,33]. By applying these values, a log BCF within the range 0.37–1.01 was obtained for methylmercury. This value is, far away from the experimental data (log K_{ow} = 1.71) given by other authors [34] and also from the extrapolated values (3.04–3.69) obtained in this study. Some authors have questioned whether use of the BCF model is appropriate for describing the relationship between bioaccumulation and

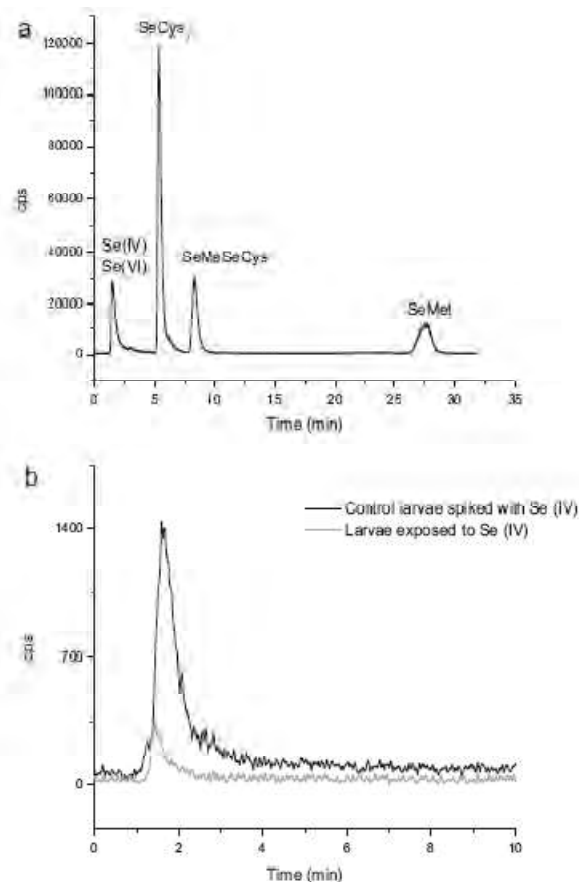


Fig. 6. Chromatographic profile obtained by reverse-phase LC-ICP-MS corresponding to (a) 50 μg L⁻¹ of selenium mixture standards and (b) selenium extracted from the zebrafish larvae. Chromatographic column: Luna C18(2)-HST.

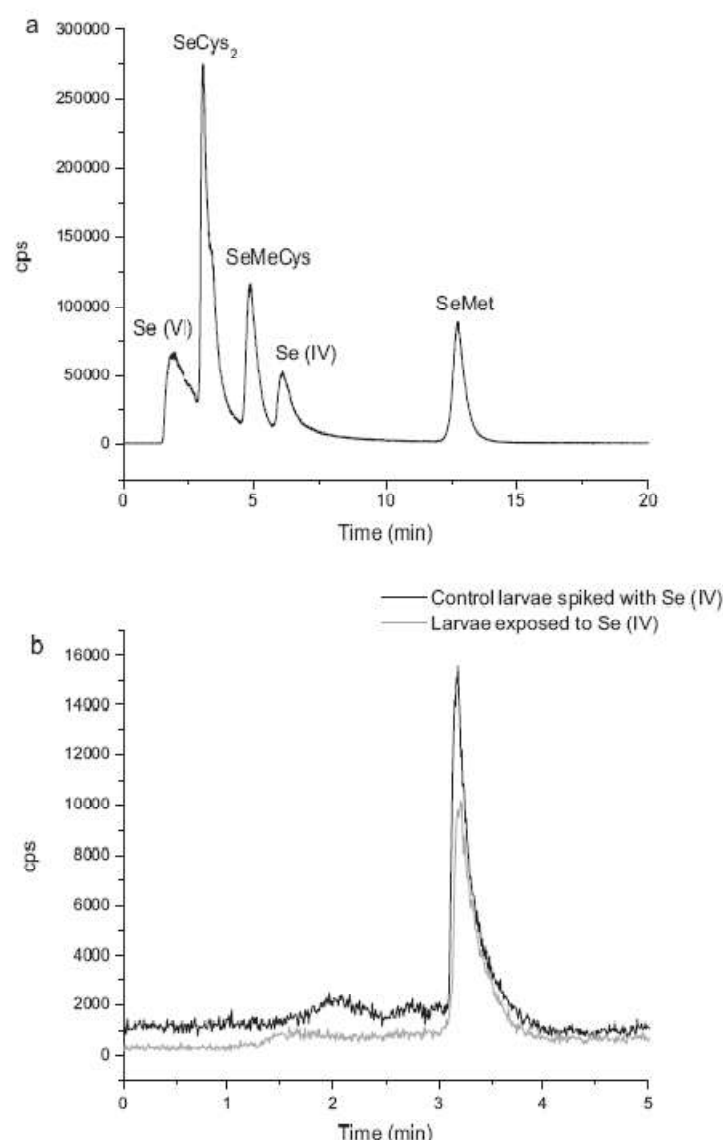


Fig. 7. Chromatographic profile obtained by reverse-phase LC-ICP-MS corresponding to (a) 50 µg L⁻¹ of selenium mixture standards and (b) selenium extracted from the zebrafish larvae. Column: Synergi-Fusion.

the potential effects of inorganic substances, as metals [27,35]. The reason of that could be attributed to the low lipophilicity of metals [11,34] compared to neutral organic substances, and therefore presenting other accumulation mechanisms in biota than those predicted by Fick's law [36]. Metals present complex internal dynamics of uptake (specific channels in the cell membrane, active transport, or endocytosis [37]) and storage (as detoxified forms, such as inorganic granules or bound to metallothionein-like proteins, active elimination) [35].

The high bioaccumulation capability of methylmercury has been explained by its ability to associate to sulphhydryl groups of proteins [8,24–26,38]. The differences in the values of the depuration constant (k_2) obtained after adjustment of data to the Eqs. (1) and (3) (Table 3) is another issue to be considered. These differences could be attributed to either the lack of experimental data to obtain a proper fitting or to the fact that the uptake of methylmercury could be affecting somehow, the depuration of methylmercury.

3.3. Exposure of larvae to selenite

3.3.1. Determination of total selenium and selenium species in exposure media and zebrafish larvae

As it is shown in Fig. 4, the concentration of selenium, added as Se(IV), in the exposure solutions (see Section 2) remains constant along the uptake phase (11.4 ± 0.7 µg L⁻¹ and 1.03 ± 0.19 µg L⁻¹ for the highest and lowest concentration, respectively). No selenium was detected during the depuration phase, neither on the control group (always below detection limits), thus fulfilling the restrictions of the OECD 305 test. Selenium concentration found in larvae exposed to 1 µg L⁻¹ was rather low and only detectable after 45 h exposure (Fig. 5).

Selenium speciation in the zebrafish larvae was performed by LC-ICP-MS after selenium species extraction by using ultrasonic probe sonication. Table 2 shows selenium extraction efficiency obtained by applying different sample treatments. As it is shown, the maximum recovery (77%) was obtained with ultrasonic probe assisted-double aqueous extraction (sample treatment D) by

Table 4

Regression values for estimating the BCF values from $\log K_{ow}$ using a linear relation $\log BCF = a + b \log K_{ow}$.

a	b	n	r ²	Life stage	Reference
-0.46 ± 0.46	0.86 ± 0.09	11	0.91	Larvae	[30]
-0.23 ± 0.05	0.60 ± 0.01	2393	0.52	Adult fishes	[31]
0.06 ± 0.11^a	0.0006 ± 0.05^a	84	0.00	Adult fishes	[31]
-1.336	1	71	0.95	Adult fishes	[32]

^a Only when $K_{ow} < 1$.

applying a sonication time of 80 s and 40% of ultrasonic amplitude. The efficiency of the extraction was not improved by further increasing the sonication time and the number of extractions. Therefore sample treatment D was selected for further speciation of selenium species since it provides the highest extraction yield while keeping species integrity [39–41]. It is important to point out that the use of enzymatic hydrolysis does not improve the efficiency of selenium extraction, which could indicate that selenium in zebrafish larvae is not bound or associate to peptide and proteins.

Fig. 6a and b shows the chromatographic profiles from Se standards solutions and zebrafish larvae exposed to Se(IV), respectively. The single peak that appears in the chromatograms of zebrafish larvae was identified by spiking experiments as Se(IV) (Fig. 6b). However, Se(VI) and Se(IV) co-elute from this column, being impossible to distinguish between these two species. To overcome this problem, different chromatographic conditions were employed using a reversed phase column with polar embedded groups (Synergi-Fusion) and a different mobile phase (Table 1. HPLC conditions (3)). By using these conditions, Se(VI) and Se(IV) were successfully separated (Fig. 7a). The chromatographic extracts of larvae exposed to Se(IV) exhibit only one peak at the same retention time that those from no exposed larvae spiked with Se(IV) (Fig. 7b). Thus, it can be concluded that Se(IV) is the unique selenium species found on exposed larvae, and therefore biotransformation of selenium did not occur.

3.3.2. Calculation of bioconcentration factors

BCF_k and BCF_{48h} values were calculated (Table 3) following the two procedures previous applied for methylmercury. BCF_k values were only calculated for larvae exposed to $10 \mu\text{g L}^{-1}$, because those exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ accumulated selenium only after 45 h, which means that there were not enough experimental data for a good fitting to a non-linear regression. Values of BCF_k and BCF_{48h} from larvae exposed to $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se(IV) were similar, showing that 48 h was enough time to reach the steady-state. BCFs values calculated in this experiment (60–74 for $10 \mu\text{g L}^{-1}$) are in good agreement with others published using bluegill fish as a model, which reported a bioconcentration factor of 56 at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [14] and also with those compiled on the ECOTOX database (bioconcentration factors ranging from 35 to 1850 [31]). BCFs values from METI-NITE Japan database [20], obtained according to the OECD 305 Guidelines but not published (BCF < 8.1–10 for an exposure concentration of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and lower than 85 for $1 \mu\text{g L}^{-1}$) are slightly lower but still within the range.

Due to the lack of experimental K_{ow} values for selenite, BCF values were calculated by using a value of $\log K_{ow} = -6.13$ provided by the estimation software KOWWINTM powered by EPI SuiteTM of U.S. Environmental Protection Agency [5]. By using this data (see Table 4 for $K_{ow} < 1$), a value of BCF of 1.13 was obtained, which is markedly lower than those previously mentioned (60–74 for $10 \mu\text{g L}^{-1}$). As methylmercury, no correlation between octanol–water partition model and BCF was obtained for selenite, and even a reverse relationship between BCFs and concentration of exposure is attained. These results strongly suggest what it was previously mentioned, that the bioaccumulation model is not suitable to be applied to inorganic compounds.

In summary, BCFs calculated in the present work by using zebrafish larvae are in good agreement with others published previously using adult fish; however a linear relation between BCFs and octanol-to-water partition was not achieved. Despite that, none of these issues diminishes the importance of bioaccumulation as a key parameter in assessing the environmental hazard associated to metals [33]. Based on the above, other metal-specific bioaccumulation models such as the biotic ligand model [42] and the free-ion activity model [43] might be used. Moreover, additional aspects such as relation between bioaccumulation and the covalent index [44,45] and the fish metabolism [46] should be explored. Some of these further studies are currently being carried out by our group.

4. Conclusions

BCFs calculated in the present work by using zebrafish larvae in a 48 h accumulation plus 24 h of depuration coupled to adjustment of experimental data to a first order kinetic accumulation model, are in good agreement with others published previously using adult fish which it makes a good and promising alternative to the OECD Bioconcentration Test 305. For this study a simple method to extract both selenium and methylmercury species from small and complex samples such as fish larvae, has been proposed. Optimized procedures for the extraction have allowed quantification of mercury and selenium species in both type of samples (water and larvae) as well as the determination of the bioaccumulation factors of these species. The extraction and cleanup methodology of larvae, a very small (less than 0.010 g of wet weight the pools of 20 larvae) and complex (lipid content around 15%) samples, presented here represents a relevant analytical advance in terms of rapidity and effectiveness for analyte leaching, low solvent consumption and low hazardous residues production, detection limits achieved, etc. Analytical procedures developed for speciation of mercury and selenium have shown that the biotransformation of species of the metals tested during the accumulation–depuration steps do not occur.

Although the use of BCFs for metals as a hazard criterion is complicated, and further studies should go in this direction, developing analytical tools that allow distinguishing between accumulated metals through biological mechanisms than those from only sequestering and storing is an important issue. The good agreement between the BCFs values found in this work and those reported in the literature clearly demonstrate that the proposed method using larvae exposed to both species is adequate. Zebrafish larvae has been shown as a good alternative to the OECD 305 bioconcentration test, which requires many adult fishes, implying a high cost, as well as complex, time-consuming experiments.

Acknowledgments

S. Cuello thank Ministry of Education and Science for the FPU predoctoral fellowship. This work was supported by Projects CTQ2008-01031/BQU from Spanish Science and Innovation Department, 046/PC08/2–14.4 from Spanish Environmental Department and S2009/AGR-1464 (ANALISYC-II) from the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain).

References

- [1] European Commission, 2006. Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, European Commission, ed, Official J. Eur. Union, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?ur=oj:L:2006:396:0001:0849:en.pdf>.
- [2] European Commission, 2008. Council Regulation (EC) No. 440/2008 of 30 May 2008 Laying Down Test Methods Pursuant to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH), European Commission, ed, Official J. Eur. Union, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?ur=CELEX:32008R0440:EN:HTML>.
- [3] Test No. 305. Bioconcentration: Flow-through Fish Test. OECD Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1996, <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/free/9730501e.pdf>.
- [4] A.V. Weisbrod, L.P. Burkhard, J. Arnot, O. Melnyan, P.H. Howard, C. Russom, R. Boethling, Y. Sakuratani, T. Traas, T. Bridges, C. Lutz, M. Bonnell, K. Woodburn, T. Parkerton, Environ. Health Perspect. 115 (2007) 255–261.
- [5] W.M. Meylan, P.H. Howard, J. Pharm. Sci. 84 (1995) 83–92.
- [6] A.V. Weisbrod, J. Sahi, H. Segner, M.O. James, J. Nichols, I. Schultz, S. Erhardt, C. Cowan-Ellsberry, M. Bonnell, B. Hoeger, Environ. Toxicol. Chem. 28 (2009) 86–96.
- [7] T.F. Parkerton, J.A. Arnot, A.V. Weisbrod, C. Russom, R.A. Hoke, K. Woodburn, T. Traas, M. Bonnell, L.P. Burkhard, M.A. Lampi, Environ. Assess. Manage. 4 (2008) 139–155.
- [8] C.Y. Iao, J.J. Fu, J.B. Shi, Q.F. Zhou, C.G. Yuan, G.B. Jiang, Environ. Toxicol. Pharm. 22 (2006) 225–233.
- [9] S.M. Ullrich, T.W. Tanton, S.A. Abdrashitova, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 31 (2001) 241–293.
- [10] R.P. Marson, J.M. Benoit, in: P. Craig (Ed.), Organometallic Compounds in the Environment, De Montfort University Press, United Kingdom, 2003, pp. 57–99.
- [11] F.N. Tsopeles, M. Th. Ochsenkühn-Petropou, A. Tsanili-Kakaoulidou, K.-M. Ochsenkühn, Study of the lipophilicity of selenium species, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 420–426.
- [12] S. Cuello, S. Ramos, R. Mateos, M.A. Martín, Y. Madrid, C. Cámara, L. Bravo, L. Goya, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 2167–2178.
- [13] A.D. Lemly, Ecotoxicol. Environ. Saf. 10 (1985) 314–338.
- [14] J.M. Besser, T.M. Canfield, T.W. Lapoint, Environ. Toxicol. Chem. 12 (1993) 57–72.
- [15] W. Meng, F. Weiyue, S. Junwen, Z. Fang, W. Bing, Z. Motao, L. Bai, Z. Yuliang, Z. Zhinfang, Talanta 71 (2007) 2034–2039.
- [16] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, Talanta 82 (2010) 594–599.
- [17] S. Rio-Segade, C. Bendicho, J. Anal. Atom. Spectrom. 14 (1999) 263–268.
- [18] J.L. Capelo, P. Ximenez-Embut, Y. Madrid, C. Cámara, Anal. Chem. 76 (2004) 233–237.
- [19] M. Westerfield, The Zebrafish Book, 5th ed., University of Oregon Press, Eugene, 2007.
- [20] Japanese Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) – National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Biodegradation and Bioconcentration Database of the Existing Chemical Substances, 2006.
- [21] Test No. 403. Revised Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2009 <http://www.oecd.org/dataoecd/54/55/41761261.pdf>.
- [22] C.F. Harrington, S.A. Merson, T.M. D'Silva, Anal. Chem. Acta. 505 (2004) 247–254.
- [23] T.T. Hoang, S.W. May, R.F. Browner, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 1575–1581.
- [24] C.Y. Liao, Q.F. Zhou, J.B. Shi, J.J. Fu, G.B. Jiang, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75 (2005) 584–591.
- [25] B. Inza, F. Ribeyre, A. Boudou, Aquat. Toxicol. 43 (1998) 273–285.
- [26] H. Amlund, A.K. Lundebye, M.H.C. Bernissen, Aquat. Toxicol. 83 (2007) 323–330.
- [27] T. Tsuda, H. Nakanishi, S. Auki, J. Takebayashi, Water Res. 22 (1998) 647–651.
- [28] D.K. DeForest K.V. Brix, W.J. Adams, Aquat. Toxicol. 84 (2007) 236.
- [29] I. Komjarova, R. Blust, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 7958–7963.
- [30] G.I. Petersen, P. Kristensen, Environ. Toxicol. Chem. 17 (1998) 1385–1395.
- [31] The ECOTOXology database. Website: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>, November, 2011.
- [32] J.A. Arnot, F.A.P.C. Gobas, Environ. Rev. 14 (2006) 257–297.
- [33] E. Halfon, Environ. Sci. Technol. 19 (1985) 747–749.
- [34] B.C. Faust, Environ. Toxicol. Chem. 11 (1992) 1373–1376.
- [35] J.C. McGeer, K.V. Brix, J.M. Skeaf, D.K. DeForest, S.I. Bringham, W.J. Adams, A. Green, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 1017–1037.
- [36] J.M. McKim, in: J.L. Hamelink, P.F. Landrum, H.L. Bergman, W.H. Bensen (Eds.), Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions, CRC, Boca Raton, 1994, pp. 179–204.
- [37] K. Simkiss, M.G. Taylor, Rev. Aquat. Sci. 1 (1989) 173–188.
- [38] H.J. Geyer, G.G. Rimkus, I. Scheunert, A. Kaune, K.-W. Schramm, A. Ketttrup, M. Zeeman, D.C.G. Muir, L.G. Hansen, D. Mackay, in: B. Beek (Ed.), The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 2, Part 1, Springer-Verlag, Heidelberg, 2000, pp. 1–163.
- [39] Z. Pedrero, Y. Madrid, Anal. Chim. Acta 634 (2009) 135–152.
- [40] P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 315–327.
- [41] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, Biol. Trace Elem. Res. 119 (2007) 195–211.
- [42] D.M. Di Toro, H.E. Allen, H.L. Bergman, J.S. Meyer, P.R. Paquin, R.S. Santore, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 2383–2396.
- [43] P.G.C. Campbell, in: A. Tessier, A. Turner (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, John Wiley, Chichester, 1995, pp. 45–102.
- [44] K. Veltman, M.A.J. Huijbregts, M. Van Kolck, W.-X. Wang, A.J. Hendriks, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 852–858.
- [45] C. Chen, J. Wang, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74 (2007) 911–917.
- [46] A.J. Hendriks, A. Heikens, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 1421–1437.

4.PROTEÓMICA CUANTITATIVA Y TOXICIDAD DE METILMERCURIO

Los dos siguientes estudios de la presente Tesis están relacionados con la toxicidad que provoca el metilmercurio y el empleo de técnicas de dos técnicas de proteómica cuantitativa diferentes: SILAC e iTRAQ.

En el primer trabajo **"Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity. Anal. Bional. Chem. 404 (2012) 315-324"** se aplicó la técnica de SILAC a células de hepatoma humano Hep G2, con el objetivo de obtener información complementaria y/o adicional de los resultados anteriores del trabajo **"Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411"**. La técnica SILAC emplea un marcaje metabólico en el cual al medio de cultivo de una de las poblaciones de células (células tratadas con $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ MeHg durante 8 horas) se les añade Lisina y Arginina marcadas en ^{13}C y estos aminoácidos durante sucesivas replicaciones serán incorporados a las proteínas. La otra población de células (células control) se trata del estado ligero puesto que la Lisina y Arginina no están marcadas con carbono trece. Tanto las células control como las células tratadas con MeHg se mezclan en la proporción 1:1 y debido al marcaje, al separar los péptidos mediante un sistema de LC-MS/MS, aparecerán pares de péptidos, con lo cual seremos capaces de averiguar si hay diferencias en la expresión de las proteínas por la presencia de MeHg en las células. Las ventajas que posee SILAC sobre otras técnicas es que resulta sencillo implementarla en cultivos celulares puesto que se consigue un marcaje de más del 90 % con solo 5 o 6 doblajes, además como se añaden los isótopos marcados en el mismo medio de cultivo, las células se pueden mezclar antes de empezar las etapas para el tratamiento de la muestra reduciendo así las fuentes de error

Para disminuir la complejidad de la muestra, se realizó una centrifugación diferencial en la cual se separó el citosol de la mitocondria, y así obtener las proteínas diferencialmente expresadas tanto en el citosol como en la mitocondria.

En el segundo trabajo **Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. Analyst 137 (2012) 5302-5311"** se han llevado a cabo

estudios de proteómica en el larvas del pez cebra. Aunque en el anterior trabajo **“Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model”** se hayan obtenido valores de los factores de bioacumulación de metilmercurio, esa información lo único que nos aporta es la capacidad que una sustancia tiene de bioacumularse. Para saber los efectos tóxicos que un compuesto es capaz de ejercer, se requiere más información. Por este motivo se realizaron estudios de proteómica, para ver si el mercurio es capaz de producir cambios en la expresión de proteínas y esa alteración sea capaz de proporcionar información útil sobre los mecanismos de toxicidad del metilmercurio. Además, hasta la fecha, no se han realizado estudios de proteómica en larvas de pez cebra para obtener información de los mecanismos de toxicidad del metilmercurio, lo que si se han llevado a cabo son estudios de expresión génica. Por eso resulta interesante aplicar nuevas metodologías que puedan aportar información adicional y/o complementaria para el esclarecimiento de los mecanismos de acción que ejerce el metilmercurio.

En este caso se utilizaron tres grupos de larvas: larvas control, larvas tratadas con 5 ppb de MeHg y larvas tratadas con 25 ppb de MeHg. En este tipo de muestras como es difícil asegurar un marcaje metabólico del 100% empleando SILAC, se llevó a cabo el análisis de la expresión de proteínas mediante el uso otra técnica de proteómicas cuantitativa: iTRAQ. En esta estrategia lo que se marcan son los péptidos y se usan unos reactivos que reaccionan con los N-terminales y las NH₂ de las cadenas laterales de los péptidos. En esta técnica se pueden comparar hasta cuatro u ocho estados, en este caso: Larvas control 1, larvas control 2, larvas tratadas con 5 ppb MeHg y larvas tratadas con 25 ppb MeHg.

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS HEPÁTICAS ASOCIADAS CON LA EXPOSICIÓN A MeHg: PROFUNDIZANDO EN LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA TOXICIDAD

S. Cuello, S. Ramos, Y. Madrid, J.L. Luque-García, C. Cámara

“Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure:
Deepening into the molecular mechanisms of toxicity”

Anal. Bioanal. Chem., 2012, 404, 315-324

Parte de este trabajo fue presentado como comunicación oral en:

“Proteomlux 2010”, Julio, 2010.

Parte de este trabajo fue presentado como poster en:

“13as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Noviembre, 2011.

A parte de este trabajo le fue concedido un premio por la Sociedad Española de
Química Analítica (SEQA) en:

“13as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Noviembre, 2011.

Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity

Susana Cuello · Sonia Ramos · Yolanda Madrid ·
Jose L. Luque-Garcia · Carmen Cámara

Received: 26 January 2012 / Revised: 3 April 2012 / Accepted: 10 April 2012 / Published online: 26 April 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Understanding the molecular mechanisms underlying MeHg toxicity and the way in which this molecule interacts with living organisms is a critical point since MeHg represents a well-known risk to ecosystems and human health. We used a quantitative proteomic approach based on stable isotopic labeling by amino acids in cell culture in combination with SDS-PAGE and nanoflow LC-ESI-LTQ for analyzing the differential protein expression of hepatic cells associated to MeHg exposure. Seventy-eight proteins were found de-regulated by more than 1.5-fold. We identified a number of proteins involved in different essential biological processes including apoptosis, mitochondrial dysfunction, cellular trafficking and energy production. Among these proteins, we found several molecules whose de-regulation has been already related to MeHg exposure, thus confirming the usefulness of our discovery approach, and new ones that helped to gain a deeper insight into the biomolecular mechanisms related to MeHg-induced

toxicity. Overexpression of several HSPs and the proteasome 26S subunit itself showed the proteasome system as a molecular target of toxic MeHg. As for the interaction networks, the top ranked was the nucleic acid metabolism, where many of the identified de-regulated proteins are involved.

Keywords Bioanalytical methods · Proteomics · Toxicology · Heavy metals · Mass spectrometry

Introduction

Contamination of ecosystems and exposure to toxic metals is a major concern all over the world. Most of the studies carried out so far to evaluate heavy-metal toxicity have focused on both: (a) the development of analytical methods for determination of the toxic species in different samples such as contaminated soils, water, plant, and animal tissues [1, 2], mainly using techniques for elemental analysis, and (b) the study of the effects of the toxic species on the environment and ultimately on human health. However, the cellular mechanisms underlying heavy-metal toxicity and the way in which toxic metals interact with living organisms [3] at the molecular level are still not fully understood. Among heavy metals, methylmercury (MeHg) represents a well-known risk to human health. Most of the knowledge on the toxic effects of MeHg has come from catastrophic episodes of poisoning. These accidents have revealed that the developing brain is particularly sensitive to MeHg [4]. It is known that ingested mercury can interact with proteins and enzymes due to its strong affinity for sulfur, causing organ dysfunction and a devastating effect on the whole central nervous system, particularly the developing brain [5]. The generation of reactive oxygen species (ROS) by MeHg as well as the active involvement of the

Published in the special paper collection *Progress on Environmental and Bioanalysis in Spain* with guest editors Alfredo Sanz-Medel and Elena Domínguez.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-012-6042-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Cuello · Y. Madrid · J. L. Luque-García (✉) · C. Cámara
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,
Complutense University of Madrid,
28040 Madrid, Spain
e-mail: jlluque@quim.ucm.es

S. Ramos
Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
José Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain

mitochondria in the process has been shown in previous studies [6, 7]. Specific proteins and mechanisms related with methylmercury-induced cell death [7] and neurotoxicity [8, 9] have also been reported using different biochemical approaches. However, little has been done to reveal the toxic effects on other organs, such as liver, that can also be considered as an important target for MeHg-induced injury [4, 10].

In the past few years, substantial improvements in protein separation and identification techniques and the expansion of genomic knowledge have led to an increase in the application of proteomic methods to answer biological questions. Proteomics, or the systematic analysis of the proteins expressed by a genome, is a powerful tool for not only describing complete proteomes at the organelle, cell, organ or tissue levels, but also for comparing proteomes as affected by different physiological conditions. Between the different alternatives for relative protein quantification, stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC) is one of the most popular alternatives due to its high accuracy and easy operation [11, 12]. SILAC is a straightforward approach based on the metabolic labeling of all the proteins in a given cell population; thus, allowing the comparison of the expression levels of hundreds of proteins in a single experiment. In a typical SILAC experiment, cells representing two different biological conditions are grown in media supplemented with “light” or “heavy” isotope-containing amino acids. Metabolic incorporation of labeled amino acids into all proteins from cells of one population, and subsequent

combination of labeled and unlabelled samples in equal ratios, enables quantification of proteins from the two samples based on the intensities of the light and heavy peptides. Within the same mass spectrometric experiment, tandem mass spectrometry (MS/MS) can be carried out to obtain sequence information for protein identification [11, 12].

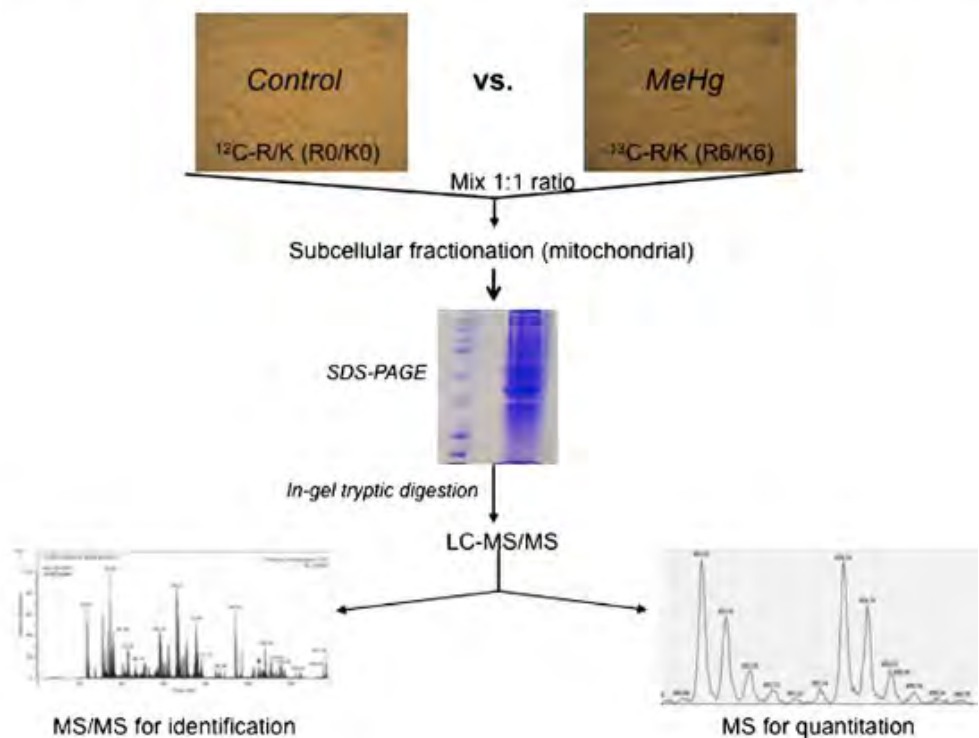
In this paper, we have used a state-of-the-art proteomic approach based on SILAC to compare (HepG2) cells treated with MeHg to characterize their differential proteomic pattern as compared with control cells (Fig. 1). De-regulated proteins associated to MeHg exposure can provide us with new insights into the complex mechanisms of cell response to toxicity and the pathways involved in cell death, cell defense, and detoxification, together with new potential biomarkers of MeHg-induced toxicity.

Experimental

Chemicals

MeHg chloride was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). EDTA, HEPES, sucrose, gentamicin, penicillin G, streptomycin, ammonium bicarbonate, and formic acid were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis were from Bio-Rad (Madrid, Spain). Cell culture dishes were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain). Lysine and arginine-depleted Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) was purchased

Fig. 1 General strategy used to study differential protein expression of hepatic cells exposed to MeHg



from Millipore (Madrid, Spain). Dialyzed fetal bovine serum (d-FBS) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). $^{13}\text{C}_6$ -lysine and $^{13}\text{C}_6$ -arginine were purchased from Cambridge Isotope Lab. Mass spectrometry-grade trypsin was purchased from Promega (Madison, WI, USA). LC-MS grade acetonitrile and water were purchased from Scharlau (Madrid, Spain).

Cell culture and metabolic labeling

Human hepatoma HepG2 cells were maintained in lysine and arginine-depleted DMEM supplemented with 2.5 % d-FBS, 50 mg L⁻¹ of gentamicin, penicillin, and streptomycin, and either isotopically normal amino acids or $^{13}\text{C}_6$ -lysine and $^{13}\text{C}_6$ -arginine. Cells were grown for at least six doublings to allow full incorporation of labeled amino acids. Cells labeled with the “heavy” amino acids were exposed to 2 mg/L of MeHg for 8 h. This MeHg concentration and exposure time was selected based on previous results and for those conditions the cell viability was around 50 % [7].

Protein fractionation

Cultured cells were washed twice with phosphate-buffered saline, collected by scraping, and centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. Control cells and cells exposed to MeHg were counted in a Neubauer chamber and mixed in a 1:1 ratio prior to protein fractionation.

For mitochondria/cytosol fractionation, cells were resuspended in hypotonic media containing 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, and 50 mM sucrose and incubated 5 min at 37 °C. Then, hypertonic media containing 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, and 450 mM sucrose was added. The supernatant was collected after centrifugation at 2,000 rpm for 5 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant obtained formed the cytosolic fraction. The pellet was resuspended with 1:1 (v/v) hypertonic/hypotonic media and was termed as the mitochondrial fraction. Proteins in both fractions were quantified using the Bradford reagent (BioRad, Madrid, Spain).

SDS-PAGE, in-gel digestion, and nanoflow LC-MS/MS

Proteins in both the cytosolic and the mitochondrial fractions were separated by SDS-PAGE on 10 % SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were visualized by Coomassie blue staining and the gel lanes were cut horizontally into 25 sections. Excised gel bands were cut into small pieces and destained in 50:50 25 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile, dehydrated with acetonitrile and dried. The gel pieces were rehydrated with 12.5 ng mL⁻¹ trypsin solution in 25 mM ammonium bicarbonate and

incubated overnight at 37 °C. Peptides were extracted using acetonitrile and 5 % formic acid, dried by vacuum centrifugation and resuspended in 15 mL of 2 % acetonitrile in 0.1 % formic acid. All samples were sonicated for 10 min before MS analysis [13]. The peptide mixtures from in-gel tryptic digestions were analyzed using nanoflow LC-MS/MS. The peptides were loaded onto a trap column (Reprosil C₁₈, 3 µm particle size, 0.3 × 10 mm, 120 Å pore size, SGE) and then eluted to the analytical column (Acclaim PepMap 100, C₁₈, 3 µm particle size, 75 µm × 15 cm, 100 Å pore size, Dionex, LC Packings) with a linear gradient of 5–80 % acetonitrile in 0.1 % formic acid. The samples were delivered over 120 min by a nano-LC ultra 1D plus system (Eksigent) at a flow-rate of 200 nL min⁻¹, through the analytical column to a stainless steel nano-bore emitter (O.D. 150 µm, I.D. 30 µm Proxeon, Odense, Denmark). The peptides were scanned and fragmented with an LTQ XL linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA) operated in data-dependent ZoomScan and MS/MS switching mode using the three most intense precursors detected in a survey scan from 400 to 1,600 u (three m-scans). ZoomScan mass window was set to 12 Da enabling monitoring of the entire $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotopic envelope of most doubly and triply charged peptides. Singly charged ions were excluded for MS/MS analysis. Normalized collision energy was set to 35 % and dynamic exclusion was applied during 3 min periods to avoid repetitive fragmentation ions.

Protein identification and quantification

Generated .raw files were converted to .mgf files for MASCOT database search. A database containing the NCBI *Homo sapiens* sequences containing 34,180 protein entries (as of 04-03-2008) was searched using MASCOT Software (version 2.3 Matrix Science) for protein identification. Search criteria included trypsin specificity with one missed cleavage allowed, and methionine oxidation and ^{13}C -Arg and ^{13}C -Lys as variable modifications. A minimum precursor fragment-ion mass accuracy of 1.2 and 0.3 Da, respectively, and a requirement of at least one bold red (unique) peptide (i.e., highest scoring peptide matching to protein with highest total score) were required for identification. For protein quantification, at least two bold red (unique) peptides were required per protein. Cut-off values for MASCOT scores of peptides and proteins were set to 39 ($p < 0.05$) and 46 ($p < 0.01$), respectively, for considering them as being accurate identifications. The false discovery rate was calculated searching the same spectra against the NCBI *Homo sapiens* decoy database. Relative quantification ratios of identified proteins were calculated using QuiXoT (version 1.3.26). Proteins ratios obtained by QuiXoT were manually verified for all peptides. As observed in previous studies, a proportion of $^{13}\text{C}_6$ -Arg was converted to $^{13}\text{C}_5$ -Pro leading to

a reduction in the intensity of the isotope-labeled peptide peak; this was corrected for all peptides containing one or more proline residues by adding the intensity found for the peptide containing $^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$ $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ or $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ $^{13}\text{C}_5\text{-Pro}$ to the intensity of the peak containing only $^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$ or $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$.

Bioinformatic-based functional analysis

Protein ID mapping was carried out by the web-free application Protein Identifiers Cross-Reference to establish the cellular localization, the biological function and the biological process in which the identified proteins are involved based on Gene Ontology annotations. Potential intracellular signaling pathways or molecules affected by MeHg exposure were identified using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software package (Ingenuity Systems Inc.). The significantly de-regulated proteins with their NCBI accession numbers and the ratio changes were uploaded as an excel spreadsheet file to the IPA server. MeHg-mediated signaling pathways were analyzed by core analysis.

Results and discussion

SILAC methodology and protein fractionation

Complete incorporation of ^{13}C -Arg and ^{13}C -Lys into HepG2 cells after six cell divisions in isotopically heavy medium was verified by MS analysis of a protein digest (data not shown). Since the mitochondria plays an important role in the regulation of cell death, isolation of the mitochondrial fraction was carried out, thus reducing the complexity of the sample and increasing the chances for the identification of low abundance proteins potentially involved in the mechanisms related to MeHg-induced toxicity. The rest of the sample after mitochondrial isolation, the so-called "cytosolic fraction" was also analyzed. In addition, to maximize the number of proteins identified, an additional protein separation step was carried out based on SDS-PAGE by which both fractions (mitochondrial and cytosol) were divided into 25 gel slices.

Identification of proteins affected by MeHg exposure

We performed two large-scale SILAC biological replicates (10^7 cells per condition) in which control HepG2 cells were compared with cells exposed to 2 mg/L of MeHg for 8 h. To eliminate any potential labeling bias, in one of the replicates the cells labeled were treated with MeHg while in the second replicate the control cells were labeled with heavy Arg and Lys. Altogether, 1,183 proteins were identified in the two SILAC experiments with a false discovery rate of

0.7 % as estimated by the number of hits against the reverse sequence/total hits $p < 0.01$. However, from those 1,183 proteins (identified with at least one unique peptide), only 459 proteins passed the criteria selected for protein quantification (at least two unique peptides in total considering both SILAC replicates; Electronic Supplementary Material Table S1). Using 1.5 as the threshold for a significant ratio change and 20 % as the maximum relative standard deviation (RSD) allowed for SILAC ratios between the replicates, 78 proteins were found de-regulated upon MeHg exposure, from which 29 proteins were "up regulated" and 49 were "down regulated" (Table 1). We chose 1.5 as a conservative cut-off because ratios of proteins found in a mixture of labeled and unlabeled cell lysates, which were expected to be present at a ratio 1:1, were measured with a maximum RSD between peptides within each protein of 20 %. The global overlap between the two SILAC experiments was 58 %. Regarding the SILAC ratio distribution, most of the identified proteins were within a SILAC ratio close to 1, as expected for a 1:1 mixture (Fig. 2).

Functional analysis of de-regulated proteins upon MeHg exposure

The functional annotation of the 78 differentially expressed proteins in control vs. MeHg-exposed HepG2 cells was assigned using the Gene Ontology database. Three main types of annotations were obtained: cellular compartment, molecular function, and biological process (Fig. 3). A high number of the de-regulated proteins were localized in the mitochondria (19 %), consistent with the subcellular fractionation performed [14], and supporting the relevance of this organelle in the mechanisms involved in MeHg-induced toxicity (Fig. 3a). The ontology analysis indicated the relevance and diversity of molecular functions, such as protein binding (41 %), nucleotide binding (27 %), catalytic activity (23 %), or metal binding (13 %; Fig. 3b). Many of the de-regulated proteins were involved in metabolic processes (34 %) and transport (17 %; Fig. 3c). The data in Fig. 3c supported previous studies on the impact of MeHg exposure since several biological processes that appeared to be significant within the de-regulated proteins include apoptosis (17 %), response to stimulus (15 %), regulation of cell cycle (4 %) and response to stress (15 %), which have been already related to general mechanisms activated upon MeHg exposure.

The data identifying de-regulated proteins was further analyzed using the IPA software to scrutinize for key biological processes and pathways of relevance regarding the mechanisms of toxicity associated to MeHg. In addition, the software was used to statistically rank the various pathways in order of significance. The top-ranked pathway by the software was the protein ubiquitination pathway. It is well known that ubiquitin binds to proteins and labels them for

Table 1 Proteins differentially expressed upon MeHg exposure of hepatic cells (HepG2)

Accession number (gi)	Protein name	Common name	Mascot score	SILAC ratio	RSD
157502193	Proteasome 26S non-ATPase subunit 13 isoform 1	PSMD13	187	11.06	15.56
4757768	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	750	9.98	12.08
24234688	Heat shock 70 kDa protein 9 precursor	HSPA9	12958	8.43	15.35
4503095	Casein kinase II alpha 1 subunit isoform a	CSNK2A1	557	8.29	10.86
5032051	Ribosomal protein S14	RPS14	487	7.51	15.77
19913418	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a1 isoform c	ATP6V0A1	156	7.51	15.07
4757810	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor	ATP5A1	4039	7.34	11.37
110611218	Ribosome binding protein 1	RRBP1	376	6.92	9.60
32189394	Mitochondrial ATP synthase beta subunit precursor	ATP5B	4461	6.87	9.23
156416003	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein precursor	SDHA	341	6.65	15.77
22749415	Integral membrane protein 1	STT3A	150	6.22	2.83
4506679	Ribosomal protein S10	RPS10	776	5.79	3.46
72534660	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	SRSF7	78.43	3.80	14.02
61743954	AHNAK nucleoprotein isoform 1	AHNAK	655	3.25	11.12
4503057	Crystallin, alpha B	CRYAB	153	2.37	7.89
9910542	SAR1a gene homolog 1	SAR1A	160	2.06	13.32
42544159	Heat shock 105kD	HSPH1	480	1.78	11.60
23308577	Phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	326	1.76	7.98
117190174	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C isoform b	HNRNPC	750	1.72	2.74
24119203	Tropomyosin 3 isoform 2	TPM3	802	1.69	19.33
4503471	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	2178	1.64	13.16
55956919	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B isoform a	HNRNPAB	772	1.63	13.07
38201714	ELAV-like 1	ELAVL1	289	1.60	13.05
219555707	Eukaryotic translation initiation factor 5A isoform A	EIF5A	877	1.55	7.00
4504301	Histone cluster 1, H4a	HIST1H4A	563	1.53	2.20
4885377	Histone cluster 1, H1d	HIST1H1D	1513	1.51	3.71
7669492	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	19060	1.50	10.25
23510338	Ubiquitin-activating enzyme E1	UBA1	817	1.50	0.75
32171186	B-cell receptor-associated protein 31 isoform b	BCAP31	269	0.67	4.78
148922911	Ninjurin 1	NINJ1	201	0.67	2.90
21389315	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1 precursor	SLC25A1	208	0.67	10.91
5453549	Peroxisredoxin 4	PRDX4	376	0.67	10.56
162417971	Signal peptidase complex subunit 2 homolog	SPCS2	417	0.67	14.43
5453832	Hypoxia upregulated 1 precursor	HYOU1	1832	0.66	10.73
34147513	RAB7, member RAS oncogene family	RAB7A	1594	0.66	17.40
4504041	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	865	0.66	10.31
169404009	Signal sequence receptor, alpha	SSR1	1958	0.66	11.46
4507789	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 isoform 1	UBE2L3	582	0.66	8.52
19923193	Heat shock 70kD protein binding protein	ST13	94	0.65	5.05
52630440	FK506-binding protein 8	FKBP8	183	0.64	7.95
5803013	Endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1 precursor	ERP29	546	0.64	8.66
4758504	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 isoform 1	HSD17B10	7218	0.64	13.18
4503971	GDP dissociation inhibitor 1	GDI1	503	0.64	13.68
56243533	Stromal cell-derived factor 2-like 1 precursor	SDF2L1	252	0.63	6.80
4557233	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase precursor	ACADS	327	0.63	11.12

Table 1 (continued)

Accession number (gi)	Protein name	Common name	Mascot score	SILAC ratio	RSD
8923390	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	CHCHD3	168	0.63	4.87
155722983	TNF receptor-associated protein 1	TRAP1	500	0.63	4.99
4757732	Programmed cell death 8 isoform 1	AIFM1	320	0.62	16.23
36796743	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	MTHFD1L	179	0.62	16.64
21361621	Phosphoglucumutase 1	PGM1	250	0.62	4.82
4885409	High density lipoprotein binding protein	HDLBP	442	0.62	0.75
4505773	Prohibitin	PHB	2110	0.60	17.94
74136552	Mesoderm development candidate 2	MESDC2	354	0.60	15.94
5902076	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 1	SRSF1	857	0.59	1.83
25777732	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 precursor	ALDH2	672	0.59	2.17
5031973	Protein disulfide isomerase A6	PDIA6	1119	0.59	16.31
19923483	GTPase Rab14	RAB14	836	0.58	14.81
5729875	Progesterone receptor membrane component 1	PGRMC1	672	0.57	12.31
41327685	Basic FGF-repressed Zic binding protein isoform a	UQCC	179	0.57	9.37
16507237	Heat shock 70 kDa protein 5	HSPA5	6551	0.57	19.91
21361181	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha 1 subunit isoform a	ATP1A1	2472	0.54	0.09
7657347	Mitochondrial carrier 2	MTCH2	511	0.54	17.91
7019415	Sec61 alpha 1 subunit	SEC61A1	82	0.54	0.52
31542947	Chaperonin	HSPD1	4497	0.53	18.34
56550051	Ubiquitin specific protease 39	USP39	186	0.52	6.36
33469968	Minichromosome maintenance complex component 7 isoform 1	MCM7	193	0.52	2.75
7705726	Thioredoxin domain containing 14 isoform 1	TMX2	156	0.52	16.43
7706495	DnaJ (Hsp40) homolog, sub-family B, member 11 precursor	DNAJB11	530	0.51	18.10
72534660	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	SRSF7	880	0.49	18.25
8923415	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 5	MARCH5	188	0.49	1.95
18375673	Regulator of nonsense transcripts 1	UPF1	543	0.47	4.82
38569475	Metaxin 1 isoform 1	MTX1	167	0.47	2.68
4757900	Calreticulin precursor	CALR	1125	0.46	12.88
24308133	Transmembrane and coiled-coil domains 1	TMCO1	353	0.46	15.52
20149568	NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 1 precursor	NDUFV1	129	0.45	13.82
11863154	Archain isoform 1	ARCN1	307	0.43	7.87
4506365	RAB2A, member RAS oncogene family	RAB2A	702	0.22	18.32

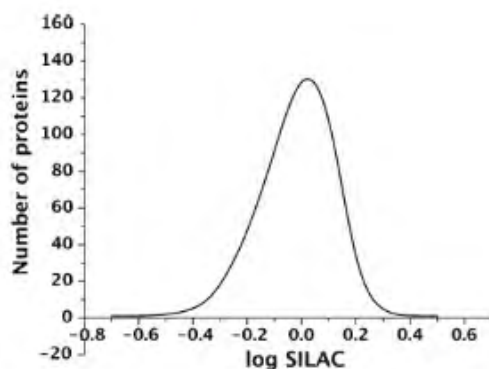


Fig. 2 SILAC ratio distribution for the identified proteins. Most of the protein ratios are within 1.5 and 0.67 as expected for a 1:1 mixture

destruction directing them to the proteasome, which is a large protein complex in the cell that degrades and recycles unneeded proteins. In response to cellular stresses, heat shock proteins (HSPs) increase the activity of the ubiquitin–proteasome system. In our study, the increased activity of the proteasome has been shown by the overexpression of several HSPs and the proteasome 26S subunit itself in response to the stress induced by MeHg exposure. This fact, as it is discussed below, shows the proteasome system as a molecular target of toxic MeHg, which could disrupt essential cellular processes. Additional pathways ranked by the IPA software included the mitochondrial dysfunction and the oxidative phosphorylation pathways. Both pathways are discussed later on as they are related to apoptosis and energy

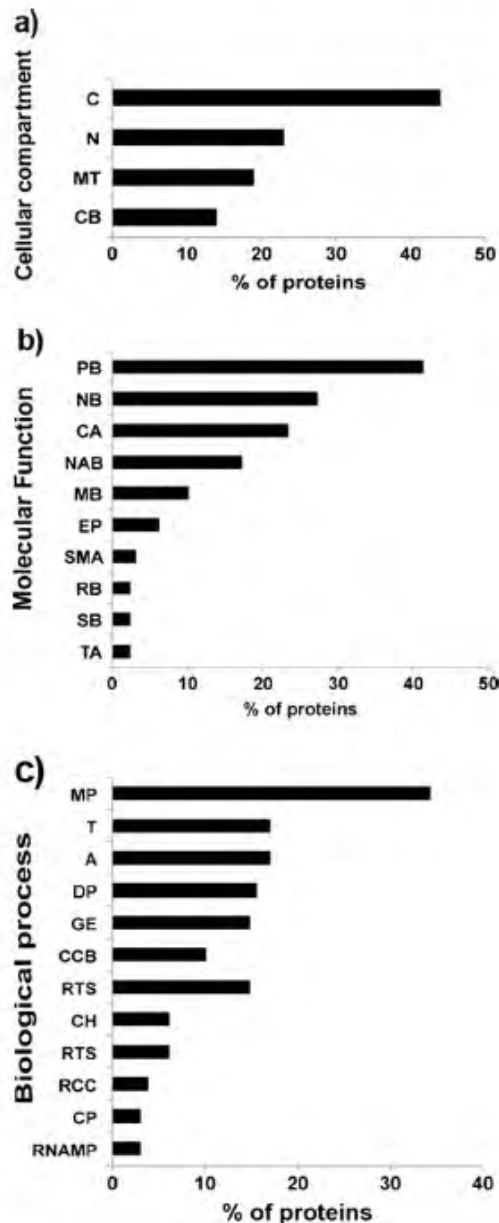


Fig. 3 Classification of the 78 de-regulated proteins according to: **a** Cellular compartment. *C* cytosol; *N* nucleus; *MT* mitochondria; *CB* cytoplasmic membrane. **b** Molecular function. *PB* protein binding; *NB* nucleotide binding; *CA* catalytic activity; *NAB* nucleic acid binding; *MB* metal binding; *EP* energy production; *SMA* structural molecule activity; *RB* ribonucleoprotein binding; *SB* steroid binding; *TA* transporter activity. **c** Biological process. *MP* metabolic process; *T* transport; *A* apoptosis; *DP* developmental process; *GE* gene expression; *CCB* cellular component biogenesis; *RTS* response to stimulus; *CH* cellular homeostasis; *RTS* response to stress; *RCC* regulation of cell cycle; *CP* cell proliferation; *RNAMP* RNA metabolic process

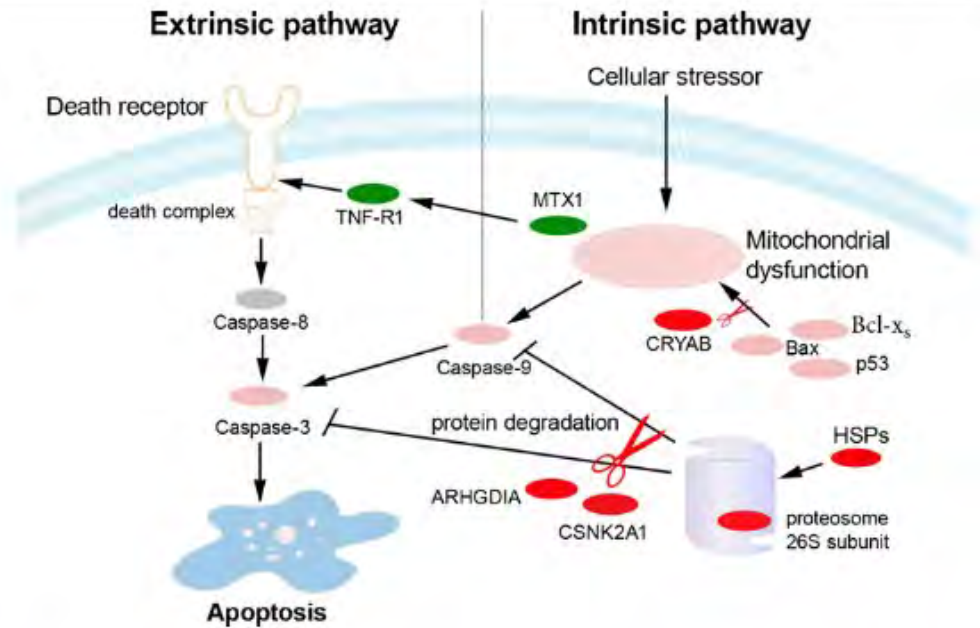
production, which are the main events affecting hepatic cells, after MeHg exposure, as observed in our experiment. As for the interaction network, the top ranked was the nucleic acid metabolism, where many of the identified de-

regulated proteins are involved (both up- and downregulated). Besides the identified proteins, other proteins such as the caspase family, that have been previously shown to undergo de-regulation after MeHg exposure [15], are also connected to this network. Other heavy metals have also been shown to exert their toxicity affecting the nucleic acid metabolism [16, 17], which correlates well with our findings for MeHg.

Proteins involved in programmed cell death (apoptosis)

Previous studies have shown that MeHg exposure causes apoptosis in different cell types [7, 18–20]. In our study, several de-regulated proteins (17 %) were involved in apoptosis (Fig. 4). Most of these proteins have an anti-apoptotic function and appeared overexpressed, thus indicating that cells are “fighting” against the damage caused by MeHg. Our study suggests that the hepatic cells are responding to MeHg damage not only by transiently increasing the GSH levels as observed in our previous work [8], but also increasing the expression of other anti-apoptotic proteins. Overexpression of HSPs has been previously related to a cell mechanism of defense against heavy-metal toxicity [3]. Four HSPs were found altered in our experiment. α -crystallin (CRYAB) has the ability to increase the resistance of cells to oxidative injuries, conferring protection against a large panel of apoptotic stimuli through binding to pro-apoptotic Bax, Bcl-x_s, and p53 polypeptides, and thus preventing their translocation to the mitochondria [21]. In addition, exposure of mouse embryonic fibroblast cell line (NIH 3T3) to several stressors, such as thermal shock, Cd²⁺, and arsenite, have led to an observed accumulation of CRYAB in the stressed cells which confers a certain degree of stress tolerance [22]. These data are in good agreement with the overexpression of CRYAB (greater than twofold increased) observed in our experiment. Mortalin (HSPA9) is a member of the HSP70 sub-family [23] and its expression in cells exposed to MeHg was clearly increased as compared to control cells ($R_{\text{SILAC}}=8.43$). Previous studies have indicated that an upregulation of HSPS9 suppresses the engagement of apoptosis from various stressors such as arsenite [24] and mercury [19]. The increased in HSPS9 levels seems to be an adaptive response to restore cellular homeostasis in a distorted and oxidative environment [25]. Heat shock 105-kDa protein (HSPH1) was also found upregulated. This protein has shown opposing anti- and pro-apoptotic effects on H₂O₂-induced apoptosis depending on the cell type [26]. HSPH1 can function as a substitute for HSP70 (ST13) to suppress aggregation of denatured proteins in cells under severe stress [27]. This could be the explanation why HSPH1 was found overexpressed in our study. Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDI) can protect cells from apoptosis because

Fig. 4 Proteins involved in the programmed cell death (apoptosis) pathway found de-regulated in the SILAC experiment. Molecules in *green* were downregulated while those in *red* appeared overexpressed. Molecules in *light red* appeared upregulated in a previous study but were not detected in the SILAC approach



it possesses the ability to protect Rac1 GTPase from apoptotic cleavage, which is an essential step in apoptotic cell death [28]. Our data revealed that hepatic cells exposed to MeHg increase the expression of this molecule by almost tenfold as compared to the control cells, being one of the most de-regulated proteins found in our experiment, thus suggesting the relevant role of this molecule in MeHg toxicity. Another anti-apoptotic protein that has been found overexpressed by more than eightfold as compared to the control cells is casein kinase II (CSNK2A1). CSNK2A1 exerts its anti-apoptotic role by protecting regulatory proteins from caspase-mediated degradation [29]. In addition, this molecule promotes cell survival by activating the Akt and Wnt signaling pathway [30]. The high overexpression exhibited by ARHGDI1 and CSNK2A1 makes them potential candidate biomarkers of toxicity. Whether such a high overexpression is specific after MeHg exposure or is a common trend for cells or organisms exposed to other heavy metals or toxic species should be further studied. Metaxin 1 (MTX1) is a mitochondrial outer membrane protein that is critical for the activation of the tumor necrosis factor (TNF) induced cell death pathway, which requires binding with the TNF receptor 1 (TNF-R1) [31]. This union produces a series of intracellular events including activation of caspase-8, which initiates a protease cascade that leads to apoptosis through the so-called extrinsic pathway [32]. In our previous study, when exposing cells to MeHg, no activation of caspase-8 was observed, whereas caspase-9 activity increased at 2 and 4 h after exposure [7]; thus indicating that the apoptotic pathway involved was the intrinsic one. The downregulation observed in our SILAC study experimented by MTX1 and the TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1), both proteins related with the extrinsic apoptotic pathway (Fig. 4), are in good agreement with our

previous results where the extrinsic apoptotic pathway remained inactivated after MeHg exposure [7].

Intracellular trafficking is affected by MeHg exposure

In our study, ten proteins related to intracellular trafficking appeared to be de-regulated, thus suggesting that MeHg exposure generates disruption of intracellular trafficking, which has been implicated in the pathogenesis of various disorders. Within these proteins, Archain 1 (ARC1) and some proteins from the Rab family were some of the most downregulated proteins found in our experiment. ARC1 is a protein involved in vesicle structure and trafficking, and it has been directly associated with neurodegenerative disorders [33]. Significantly, this is the second more inhibited protein found in our study and its downregulation could represent a link with the well-known neurotoxic effect of MeHg [4]. In the same way, we found downregulated some Rab proteins, which play key roles in the vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi and in the late endocytic pathway. Disruption of these mechanisms has also been linked to neurodegeneration [34].

Implication of the mitochondrial electron transport chain in MeHg toxicity

Several studies have demonstrated that MeHg toxicity is closely related with the mitochondrial electron transport chain (mETC), and thus with the generation of ROS, which could be sufficient to induce cell death [35]. In our study, several de-regulated proteins related with the mETC have been identified, thus supporting the previous affirmations. Actually, as shown before by the IPA data analysis, one of

the top canonical pathways represented by our data is the mitochondrial dysfunction. Although in the mETC, complexes I and III have been identified as the main sites for ROS production [7], complex II has also been proved to be involved in the generation of ROS [31] (Fig. 5). In our study, the enzyme succinate dehydrogenase, which belongs to complex II has been found highly overexpressed after MeHg exposure (almost sevenfold as compared to control cells). This correlates well with the increased ROS production observed in previous studies and the fact that the cells undergo apoptosis. In the same way, other three proteins involved in complex V, ATP synthases (ATP5A1 and ATP5B) and ATPase (ATP6V0A1) have also been found highly overexpressed in MeHg-exposed cells. A previous study [36] demonstrated an increase in the mitochondrial calcium levels after exposing cerebellar granule cells to MeHg. Since the primary role of mitochondrial calcium is the stimulation of several proteins including ATP synthase [37], this could explain the overexpression observed in our data. The increased ATPase activity has also been observed in previous *in vitro* [38] and *in vivo* MeHg toxicity-related studies [39]. As a consequence, the over activation of complex V is also probably contributing to the increased production of ROS. In addition, the R_{SILAC} calculated for the ATPase was slightly higher than those of ATP synthases, which suggest disequilibrium in the mitochondria. Moreover, one of the main proteins involved in complex I, NADH dehydrogenase (NDUFV1), has been found down regulated after MeHg exposure. This inhibition could cause alterations in the electrochemical potentials of the membranes, thus leading to the observed mitochondrial dysfunction.

Additional proteins and mechanisms affected by MeHg exposure

According to the results derived from our SILAC experiment, other proteins that could play an important role in MeHg-induced toxicity and the biological processes that could be affected are as follows: The proteasome 26 subunit (PSMD13) exhibited the higher upregulation observed in

our experiment. PSMD13 constitutes the central proteolytic machinery of the ubiquitin/proteasome system and it is the responsible for degrading a variety of cellular proteins. In fact, basic cellular processes that regulate cell proliferation and apoptosis in eukaryotes depend on protein degradation by the 26S proteasome. PSMD13 has opposite functions since it is involved in induction, but also in the suppression of apoptosis in eukaryotic cells. This dual function is related with the fact that the 26S proteasome is able to degrade pro-apoptotic as well as anti-apoptotic proteins [40]. In any case, the significant overexpression of this protein constitutes another evidence of the relevant role of the apoptotic pathway within the MeHg-induced toxicity mechanisms. Several ribosomal proteins have also been found de-regulated showing alterations in the biosynthetic machinery, which has also been observed in zebrafish fed with a MeHg-containing diet [41]. Thiredoxin (TMX2) can protect cells by scavenging free radicals, regulating transcription factors, and modifying the structure of proteins by reduction of disulfides [42]. *In vitro* and *in vivo* studies [43] have shown that MeHg and Hg^{2+} inhibit the activity of TMX2 [42], which is in good agreement with the results obtained in our SILAC experiment.

Conclusions

We have presented a proteomic approach based on the combination of SILAC, SDS-PAGE, and nanoflow LC-MS for the identification of differentially expressed proteins upon MeHg exposure in hepatic cells, with the aim of gaining a deeper insight into the biomolecular mechanisms involved in MeHg-induced toxicity. As far as we are concerned, this is actually the first time that a state-of-the-art quantitative proteomic approach based on metabolic labeling has been used with this purpose. A previous cellular fractionation step has allowed the identification of low abundance mitochondrial proteins closely related to MeHg toxicity. We have identified a significant number of proteins that appeared to be de-regulated after MeHg exposure. Seventeen percent of all the identified de-regulated proteins are involved in apoptosis, showing the key

Fig. 5 Proteins involved in the mETC and found de-regulated in the SILAC experiment. Molecules in green were down-regulated while those in red appeared overexpressed



role played by the mitochondrial apoptotic pathway in MeHg-induced toxicity. Several proteins involved in intracellular trafficking have shown the lowest SILAC ratios, suggesting that MeHg exposure generates disruption of intracellular trafficking, which is involved in the pathogenesis of various disorders, including neurodegenerative disorders. The over activation found in some of the mETC's complexes (several proteins related to them were de-regulated) can be related to the increase of ROS production, which could be sufficient to induce cell death.

The proposed approach has allowed a deeper understanding into the hepatotoxic effects of MeHg, pointing out several proteins involved in the mechanisms of defense and toxicity and also confirming previous results, thus opening up the knowledge on the mercury toxic effects.

Acknowledgments This work was partially supported by grants CTQ2010-18644 and CTQ2011-28328C02-01 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and a grant from the *Comunidad de Madrid* (Analisis II). J.L.L.-G. was financially supported by the "Ramón y Cajal" program from the Spanish Ministry of Science and Innovation. S.C. was supported by a FPU predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education.

References

- Morales-Muñoz S, Luque-García JL, Luque de Castro MD (2003) *Spectrochim Acta B* 58:159–165
- Morales-Muñoz S, Luque-García JL, Luque de Castro MD (2004) *Anal Chim Acta* 515:343–348
- Luque-García JL, Cabezas-Sánchez P, Cámara C (2011) *Trends Anal Chem* 5:703–716
- Ji X, Wang W, Cheng J, Yuan T, Zhao X, Zhang H, Qu L (2006) *Environ Toxicol Pharmacol* 22:309–314
- Eto K (1997) *Toxicol Pathol* 25:614–623
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M (2007) *Braz J Med Biol Res* 40:285–291
- Cuello S, Goya L, Madrid Y, Campuzano S, Pedrero M, Bravo L, Cámara C, Ramos S (2010) *Food Chem Toxicol* 48:1405–1411
- Engel GL, Delwig A, Rand MD (2012) *Toxicol In Vitro* 26:485–492
- Fujimura M, Usuki F (2012) *Toxicol Sci* 126:506–514
- Mori N, Yasutake A, Hirayama K (2007) *Arch Toxicol* 81:776–796
- Ong SE, Mann M (2006) *Nat Protoc* 1:2650–2660
- Luque-García JL, Martínez-Torrecuadrada JL, Epifano C, Cañamero M, Babel I, Casal JI (2010) *Proteomics* 10:940–952
- Luque-García JL, Zhou G, Spellman DS, Sun TT, Neubert TA (2008) *Mol Cell Proteomics* 7:308–314
- Calvo SE, Mootha VK (2010) *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:25–44
- Close AH, Guo TL, Shenker BJ (1999) *Toxicol Sci* 49:68–77
- Amara IE, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AO (2010) *Toxicol Lett* 199:225–233
- Hsu T, Tsai HT, Huang KM, Luan MC, Hsieh CR (2010) *Chemosphere* 81:748–754
- Araragi S, Kondoh M, Kawase M, Saito S, Higashimoto M, Sato M (2003) *Toxicology* 184:1–9
- Shenker BJ, Guo TL, Insug O, Shapiro IM (1999) *Toxicol Appl Pharmacol* 157:23–35
- Tamm C, Duckworth J, Hermason O, Ceccatelli S (2006) *J Neurochem* 97:69–78
- Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P (2007) *FEBS Lett* 581:3665–3674
- Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A (1991) *Proc Natl Acad Sci* 88:3652–3656
- Stacchiotti A, Ricci F, Rezzani R, Li Volti G, Borsani E, Lavazza A, Bianchi R, Rodella LF (2006) *J Histochem Cytochem* 54:1149–1157
- Lau ATY, He QY, Chiu JF (2004) *Biochem J* 382:641–650
- Lam SH, Winata CL, Tong Y, Korzh S, Lim WS, Korzh V, Spitsbergen J, Matahavan S, Miller LD, Liu ET, Gong Z (2006) *Physiol Genomics* 27:351–361
- Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, Sakai K (2001) *Biophys Res Commun* 288:528–534
- Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y, Hatayama T (2003) *FEBS Lett* 555:390–396
- Zhang BL, Zhang YQ, Dagher MC, Shacter E (2005) *Cancer Res* 65:6054–6062
- Litchfield DW (2003) *Biochem J* 369:1–15
- Chakraborty A, Werner JK, Koldobskiy MA, Mustafa AF, Juluri KR, Pictrapaoli J, Snowman AM, Snyder SH (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2205–2209
- Ono K, Wang X, Kim SO, Armstrong LC, Bornstein P, Han J (2010) *Protein Cell* 1:161–173
- Chen G, Goeddel DV (2002) *Science* 296:1634–1635
- Xu X, Kedlaya R, Higuchi H, Ikeda S, Justice MJ, Setaluri V, Ikeda A (2010) *PLOS Genet* 6:1–13
- Baskys A, Bayazitov I, Zhu E, Fang L, Wang R (2007) *Ann NY Acad Sci* 1122:13–329
- Kaur P, Aschner M, Syversen T (2007) *Toxicology* 230:164–177
- Limke TL, Otero-Montanez JK, Atchison WD (2003) *J Pharmacol Exp Ther* 304:949–958
- Brookes PS, Yisang Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S-S (2004) *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817–C833
- Weinberg JM, Harding PG, Humes HD (1982) *J Biol Chem* 257:60–67
- Sone N, Larsstuvold MK, Kagawa Y (1977) *J Biochem* 82:859–868
- Naujokat C, Hoffmann S (2002) *Lab Invest* 82:965–980
- Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A, Bourdineaud J-P (2010) *Environ Sci Technol* 44:469–475
- Gao J, Zhu Z-R, Ding H-Q, Qian Z, Zhu L, Ke Y (2007) *Neurochem Int* 50:379–385
- Zhong L, Arnér ESJ, Ljung J, Aslund F, Holmgren A (1998) *J Biol Chem* 273:8581–8591

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Differential Protein Expression of Hepatic Cells Associated with MeHg Exposure: Deepening Into the Molecular Mechanisms of Toxicity

Susana Cuello, Sonia Ramos, Yolanda Madrid, Jose L. Luque-Garcia, Carmen Cámara

Table S1. SILAC ratios for all the proteins identified in our experiment

Accession number (gi)	Protein name	Mascot Score	SILAC Ratio	RSD	Sequence Coverage	Number of peptides
157502193	proteasome 26S non-ATPase subunit 13 isoform 1 [Homo sapiens]	187	11.06	15.56	25	9
4757768	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha [Homo sapiens]	750	9.98	12.08	18.6	5
24234688	heat shock 70kDa protein 9 precursor [Homo sapiens]	12958	8.43	15.35	45.4	27
4503095	casein kinase II alpha 1 subunit isoform a [Homo sapiens]	557	8.29	10.86	43.2	15
5032051	ribosomal protein S14 [Homo sapiens]	487	7.51	15.77	52.3	9
19913418	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a1 isoform c [Homo sapiens]	156	7.51	5.07	14.4	13
86991438	splicing factor, arginine/serine-rich 5 [Homo sapiens]	254	7.47	1.11	31.6	11
4757810	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]	4039	7.34	1.37	47.2	22
110611218	ribosome binding protein 1 [Homo sapiens]	376	6.92	9.60	22.1	18
32189394	mitochondrial ATP synthase beta subunit precursor [Homo sapiens]	4461	6.87	9.23	49.9	21
156416003	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein precursor [Homo sapiens]	341	6.65	5.77	17	8
22749415	integral membrane protein 1 [Homo sapiens]	150	6.22	2.83	12.6	9
4506679	ribosomal protein S10 [Homo sapiens]	776	5.79	3.46	39.4	7
61743954	AHNAK nucleoprotein isoform 1 [Homo sapiens]	655	3.25	11.12	19.6	104
4503057	crystallin, alpha B [Homo sapiens]	153	2.37	7.89	31.4	5
9910542	SAR1a gene homolog 1 [Homo sapiens]	160	2.06	13.32	28.3	6
42544159	heat shock 105kD [Homo sapiens]	480	1.78	1.60	26.9	18
23308577	phosphoglycerate dehydrogenase [Homo sapiens]	326	1.76	7.98	21.4	10
117190174	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C isoform b [Homo sapiens]	750	1.72	2.74	38.6	11
24119203	tropomyosin 3 isoform 2 [Homo sapiens]	802	1.69	19.33	52.8	19
4503471	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 [Homo sapiens]	2178	1.64	13.16	29.2	12

55956919	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B isoform a [Homo sapiens]	772	1.63	13.07	26.5	10
38201714	ELAV-like 1 [Homo sapiens]	289	1.60	13.05	31	8
219555707	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform A [Homo sapiens]	877	1.55	7.00	52.7	10
4504301	histone cluster 1, H4a [Homo sapiens]	563	1.53	2.20	42.7	6
4885377	histone cluster 1, H1d [Homo sapiens]	1513	1.51	3.71	19.5	7
7669492	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	19060	1.50	10.25	36.4	9
23510338	ubiquitin-activating enzyme E1 [Homo sapiens]	817	1.50	0.75	23.9	19
15431303	ribosomal protein L9 [Homo sapiens]	658	1.48	9.27	34.9	6
5453555	ras-related nuclear protein [Homo sapiens]	454	1.47	10.21	28.7	7
4506695	ribosomal protein S19 [Homo sapiens]	187	1.46	15.23	49	9
4502209	ADP-ribosylation factor 5 [Homo sapiens]	485	1.44	2.28	58.9	9
124494254	ErbB3-binding protein 1 [Homo sapiens]	329	1.44	8.55	38.1	13
55770864	THO complex 4 [Homo sapiens]	338	1.44	5.17	36.6	9
56699409	RNA binding motif protein, X-linked [Homo sapiens]	431	1.44	10.72	29.2	13
163965366	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit isoform a [Homo sapiens]	974	1.41	16.34	9.8	17
4826730	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 [Homo sapiens]	33	1.41	0.49	15.3	29
21361794	TIP120 protein [Homo sapiens]	738	1.41	6.92	28.8	28
24797086	importin 5 [Homo sapiens]	545	1.41	12.95	23	16
4758988	RAB1A, member RAS oncogene family isoform 1 [Homo sapiens]	3169	1.40	16.14	68.3	12
14043072	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens]	11261	1.40	12.87	57.8	20
40217847	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1 [Homo sapiens]	2070	1.40	11.50	33.9	65
5453603	chaperonin containing TCP1, subunit 2 [Homo sapiens]	367	1.40	5.76	27.5	11
21040371	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39 [Homo sapiens]	316	1.39	8.92	31.4	10
4505591	peroxiredoxin 1 [Homo sapiens]	1784	1.39	11.89	11.89	14
11968182	ribosomal protein S18 [Homo sapiens]	439	1.39	16.31	50	10
4502201	ADP-ribosylation factor 1 [Homo sapiens]	824	1.38	10.98	61.9	11
4507645	triosephosphate isomerase 1 isoform 1 [Homo sapiens]	4397	1.37	5.63	43	9
32483374	nucleolar protein 5A [Homo sapiens]	637	1.37	13.91	29.1	15

4506743	ribosomal protein S8 [Homo sapiens]	3040	1.37	7.16	38.9	9
21361370	brain glycogen phosphorylase [Homo sapiens]	395	1.37	9.46	21	15
4503509	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 theta, 150/170kDa [Homo sapiens]	955	1.37	11.42	29.7	37
4557305	fructose-bisphosphate aldolase A [Homo sapiens]	631	1.37	7.17	34.1	12
14141193	ribosomal protein S9 [Homo sapiens]	743	1.36	14.86	62.4	21
4758304	protein disulfide isomerase A4 [Homo sapiens]	698	1.35	9.74	24.7	17
4503571	enolase 1 [Homo sapiens]	1465	1.35	1.68	39.2	15
223029410	talin 1 [Homo sapiens]	1446	1.35	13.06	29	58
4507949	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide [Homo sapiens]	1202	1.34	2.56	69.5	15
4826659	F-actin capping protein beta subunit [Homo sapiens]	266	1.34	16.68	27.9	7
24307939	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon) [Homo sapiens]	364	1.33	8.73	39	19
7706254	NOP58 ribonucleoprotein homolog [Homo sapiens]	1101	1.33	8.33	33.5	15
38455427	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta) [Homo sapiens]	781	1.31	8.30	39.1	16
5803181	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) [Homo sapiens]	426	1.31	7.33	30.9	17
4505763	phosphoglycerate kinase 1 [Homo sapiens]	1990	1.30	9.35	55.4	21
14141152	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform a [Homo sapiens]	768	1.30	13.55	50.1	29
34740329	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Homo sapiens]	3735	1.30	9.37	44.7	17
4502211	ADP-ribosylation factor 6 [Homo sapiens]	163	1.29	9.82	29.7	4
25777600	proteasome 26S non-ATPase subunit 1 [Homo sapiens]	138	1.29	11.84	14.8	11
6005860	ribosomal protein L35 [Homo sapiens]	349	1.29	3.50	41.5	5
5453607	chaperonin containing TCP1, subunit 7 isoform a [Homo sapiens]	932	1.29	8.78	45.9	21
4506713	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor [Homo sapiens]	659	1.29	9.57	39.7	7
6912634	ribosomal protein L13a [Homo sapiens]	396	1.29	11.30	41.4	10
4503529	eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 1 [Homo sapiens]	1309	1.29	9.71	49.8	17
4506707	ribosomal protein S25 [Homo sapiens]	395	1.28	5.93	29.6	5
4758256	eukaryotic translation initiation factor	955	1.28	6.64	55.6	20

	2, subunit 1 alpha, 35kDa [Homo sapiens]					
114155140	tropomyosin 3 isoform 1 [Homo sapiens]	445	1.28	3.47	38.9	13
4503483	eukaryotic translation elongation factor 2 [Homo sapiens]	3391	1.28	7.67	38.2	31
100913206	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 [Homo sapiens]	750	1.28	17.88	23.5	22
68509926	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 [Homo sapiens]	583	1.27	6.39	33.2	21
74136883	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U isoform a [Homo sapiens]	1132	1.27	10.79	25.6	21
5031755	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 2 [Homo sapiens]	480	1.27	17.74	21.2	12
4504483	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 [Homo sapiens]	559	1.27	10.51	30.7	7
116805322	gamma filamin isoform a [Homo sapiens]	2855	1.27	10.96	32.6	63
18105048	histone cluster 1, H2bk [Homo sapiens]	4733	1.26	4.59	49.2	7
5803227	tyrosine 3/tryptophan 5 - monooxygenase activation protein, theta polypeptide [Homo sapiens]	1381	1.26	8.76	50.6	13
4505409	nucleoside diphosphate kinase B [Homo sapiens]	223	1.26	11.08	63.2	8
4506787	IQ motif containing GTPase activating protein 1 [Homo sapiens]	1688	1.25	13.30	20.8	33
4502107	annexin 5 [Homo sapiens]	4110	1.25	13.18	53.4	17
7661920	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 3 [Homo sapiens]	305	1.25	11.13	29.9	8
42558250	membrane component chromosome 11 surface marker 1 isoform 1 [Homo sapiens]	170	1.25	5.60	11.3	7
18379349	vesicle amine transport protein 1 [Homo sapiens]	450	1.24	4.56	22.1	7
4507761	ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor [Homo sapiens]	427	1.24	7.84	54.7	7
23110944	proteasome alpha 6 subunit [Homo sapiens]	553	1.24	13.93	39.4	8
21464101	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide [Homo sapiens]	1213	1.23	10.81	58.3	14
5031857	L-lactate dehydrogenase A isoform 1 [Homo sapiens]	2774	1.23	6.71	33.7	11
21327715	transcription elongation regulator 1 isoform 1 [Homo sapiens]	137	1.23	1.53	12.6	14
87196351	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box	869	1.23	5.69	24	15

	polypeptide 3 [Homo sapiens]					
10800144	histone cluster 1, H2aj [Homo sapiens]	548	1.23	6.07	33.6	4
4506661	ribosomal protein L7a [Homo sapiens]	2770	1.22	5.75	42.1	13
34098946	nuclease sensitive element binding protein 1 [Homo sapiens]	281	1.22	10.95	34.6	8
20149675	EF-hand domain family, member D2 [Homo sapiens]	171	1.22	12.65	37.9	11
55956788	nucleolin [Homo sapiens]	4417	1.22	9.24	23.9	20
91807122	annexin A8L2 [Homo sapiens]	723	1.22	8.50	46.8	13
214010226	ribosomal protein S24 isoform d [Homo sapiens]	1080	1.21	8.64	26.6	7
4507357	transgelin 2 [Homo sapiens]	1305	1.20	9.03	61.8	13
33350932	cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 [Homo sapiens]	1041	1.20	3.96	18.8	65
48762932	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) [Homo sapiens]	895	1.20	8.52	38.9	20
4507947	tyrosyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	340	1.19	2.53	43.2	23
5803225	tyrosine 3/tryptophan 5 - monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide [Homo sapiens]	4029	1.19	2.47	69.4	20
4826734	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma) [Homo sapiens]	423	1.19	6.70	24.3	12
4506617	ribosomal protein L17 [Homo sapiens]	3436	1.19	10.19	35.3	8
4507143	sorting nexin 3 isoform a [Homo sapiens]	156	1.18	9.65	43.8	8
4757926	RNA binding motif protein 39 isoform b [Homo sapiens]	322	1.18	3.28	36.6	13
4506667	ribosomal protein P0 [Homo sapiens]	2397	1.18	7.36	41.6	14
23110942	proteasome alpha 5 subunit [Homo sapiens]	834	1.18	12.06	41.5	9
4504445	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a [Homo sapiens]	4165	1.18	2.96	60.3	20
4505753	bisphosphoglycerate mutase 1 [Homo sapiens]	3712	1.18	9.46	60.6	13
20149594	heat shock 90kDa protein 1, beta [Homo sapiens]	4540	1.18	14.73	50.8	40
4758138	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 [Homo sapiens]	982	1.17	7.84	40.6	26
5174447	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 [Homo sapiens]	2409	1.17	2.65	42.9	14
15431293	ribosomal protein L15 [Homo sapiens]	570	1.16	13.15	40.7	9
4502549	calmodulin 2 [Homo sapiens]	357	1.16	9.59	36.9	3
7657069	ERO1-like [Homo sapiens]	259	1.16	11.28	25.6	10
156071459	solute carrier family 25, member 5 [Homo sapiens]	7678	1.15	12.87	51	21

4506623	ribosomal protein L27 [Homo sapiens]	327	1.15	6.57	55.1	8
223890243	ribosomal protein L10 [Homo sapiens]	1453	1.15	3.39	23.8	7
10835063	nucleophosmin 1 isoform 1 [Homo sapiens]	8182	1.14	7.60	41.2	11
33286418	pyruvate kinase, muscle isoform M2 [Homo sapiens]	5203	1.14	7.79	38.8	19
195539395	proteasome 26S ATPase subunit 6 [Homo sapiens]	455	1.14	16.16	43.7	14
16306548	seryl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	808	1.14	11.14	31.1	17
5031571	actin-related protein 2 isoform b [Homo sapiens]	329	1.14	9.38	40.1	15
5729877	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 [Homo sapiens]	4592	1.13	11.14	55.4	29
29788785	tubulin, beta [Homo sapiens]	1632	1.13	1.93	39.9	15
19923485	cisplatin resistance-associated overexpressed protein [Homo sapiens]	282	1.13	15.34	17.6	5
148536853	coatamer protein complex, subunit alpha isoform 2 [Homo sapiens]	1068	1.13	16.94	27.9	31
4507877	vinculin isoform VCL [Homo sapiens]	612	1.13	7.58	44.2	35
40068518	phosphogluconate dehydrogenase [Homo sapiens]	477	1.12	8.92	21.9	8
57863257	T-complex protein 1 isoform a [Homo sapiens]	1291	1.12	11.38	40.3	17
209693439	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1) [Homo sapiens]	378	1.12	1.52	36.2	5
11415026	ribosomal protein L18a [Homo sapiens]	136	1.12	0.15	26.7	5
32967311	ephrin receptor EphA2 [Homo sapiens]	542	1.11	9.85	19.7	17
5803167	splicing factor 3a, subunit 3 [Homo sapiens]	419	1.11	9.10	27.9	11
194097352	actinin, alpha 1 isoform c [Homo sapiens]	1004	1.11	14.45	41.4	33
17105394	ribosomal protein L23a [Homo sapiens]	783	1.10	17.13	44.2	11
4502101	annexin I [Homo sapiens]	2510	1.10	9.06	43.4	13
29029559	CSE1 chromosome segregation 1-like protein [Homo sapiens]	854	1.10	7.58	35.3	28
5453998	importin 7 [Homo sapiens]	298	1.10	9.63	21.9	17
16933567	mel transforming oncogene [Homo sapiens]	775	1.10	9.32	50.2	9
14210536	tubulin, beta 6 [Homo sapiens]	645	1.09	3.18	30.7	11
14165469	ribosomal protein S15a [Homo sapiens]	234	1.09	3.39	63.8	9
116805340	glycyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	205	1.09	18.44	18	14
54112121	splicing factor 3b, subunit 3 [Homo sapiens]	1227	1.09	7.41	40.2	36
15718687	ribosomal protein S3 [Homo sapiens]	3489	1.09	14.20	64.6	16

4504255	H2A histone family, member Z [Homo sapiens]	237	1.09	14.27	31.3	5
41872583	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2 [Homo sapiens]	410	1.08	4.23	16.4	22
5803187	transaldolase 1 [Homo sapiens]	549	1.08	5.52	32.3	13
171460914	dynamin 1-like isoform 1 [Homo sapiens]	623	1.08	4.22	36.4	17
168229248	asparagine synthetase [Homo sapiens]	289	1.07	10.07	26.7	14
21614499	eZRin [Homo sapiens]	415	1.07	10.40	20.1	12
4506741	ribosomal protein S7 [Homo sapiens]	615	1.07	9.27	68	14
7706322	homeobox prox 1 [Homo sapiens]	256	1.07	1.57	42.6	9
154146191	heat shock 90kDa protein 1, alpha isoform 2 [Homo sapiens]	3954	1.06	17.69	41.9	33
38327039	heat shock 70kDa protein 4 [Homo sapiens]	822	1.06	5.27	37.5	28
4506723	ribosomal protein S3a [Homo sapiens]	6875	1.06	5.02	51.1	16
13569962	RAB1B, member RAS oncogene family [Homo sapiens]	2945	1.06	9.72	64.7	11
20127454	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase [Homo sapiens]	302	1.06	11.97	25	14
4506691	ribosomal protein S16 [Homo sapiens]	395	1.06	2.38	56.8	11
6005942	valosin-containing protein [Homo sapiens]	1612	1.05	8.00	52.5	33
4504263	histone cluster 1, H2bm [Homo sapiens]	4733	1.05	13.24	58.7	8
5453990	proteasome activator subunit 1 isoform 1 [Homo sapiens]	861	1.05	7.99	47	13
38201621	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 isoform 1 [Homo sapiens]	333	1.04	2.21	17.9	23
5031815	lysyl-tRNA synthetase isoform 2 [Homo sapiens]	116	1.04	0.69	20.3	12
213417911	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator isoform 2 [Homo sapiens]	113	1.04	7.13	27.5	6
12025678	actinin, alpha 4 [Homo sapiens]	1349	1.03	11.35	41.2	33
4758012	clathrin heavy chain 1 [Homo sapiens]	4068	1.03	9.22	46.5	60
5454158	valyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	470	1.02	6.21	22.3	23
46367787	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 [Homo sapiens]	1414	1.02	11.72	47.5	33
14165435	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform b [Homo sapiens]	1584	1.02	17.13	43.6	19
5730023	RuvB-like 2 [Homo sapiens]	418	1.01	8.88	31.5	12
23397427	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein [Homo sapiens]	1108	1.01	13.05	45.1	24
44889481	myosin IB isoform 2 [Homo sapiens]	178	1.01	4.66	16	14
4503523	eukaryotic translation initiation factor	181	1.01	1.44	20.3	10

	3 subunit D [Homo sapiens]					
18105007	carbamoylphosphate synthetase 2/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase [Homo sapiens]	588	1.01	8.50	19.7	35
41393545	RAB5C, member RAS oncogene family isoform b [Homo sapiens]	1083	1.01	1.89	44.4	7
4506467	radixin [Homo sapiens]	545	1.01	9.54	28.1	16
88999583	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle isoform 2 [Homo sapiens]	355	1.01	5.63	79.5	8
52487191	thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum) [Homo sapiens]	75	1.01	18.12	10.6	4
7019485	programmed cell death 6 [Homo sapiens]	428	1.01	17.75	26.7	5
19923315	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial) [Homo sapiens]	927	1.01	17.80	36.7	17
7305053	myoferlin isoform a [Homo sapiens]	768	1.00	12.28	22.4	39
4503727	FK506 binding protein 3, 25kDa [Homo sapiens]	159	1.00	4.19	29.9	7
4507943	exportin 1 [Homo sapiens]	750	1.00	10.76	25.5	22
19913441	hippocalcin-like 1 [Homo sapiens]	295	1.00	2.86	62.7	15
15431295	ribosomal protein L13 [Homo sapiens]	377	1.00	10.21	28	6
15431301	ribosomal protein L7 [Homo sapiens]	1122	1.00	8.57	50.8	19
145275185	MYG1 protein [Homo sapiens]	167	1.00	3.76	16.2	7
6005926	U2 (RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 2 isoform a [Homo sapiens]	346	1.00	5.46	24.8	10
33695095	ras-related GTP-binding protein RAB10 [Homo sapiens]	1562	1.00	9.49	66.5	13
14591909	ribosomal protein L5 [Homo sapiens]	654	1.00	3.76	33	12
7705433	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6 interacting protein [Homo sapiens]	614	1.00	8.42	36.7	16
156104878	glutaminase [Homo sapiens]	670	0.99	9.32	29.1	13
4504447	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2 [Homo sapiens]	863	0.99	10.50	46.3	11
109134349	coatamer protein complex, subunit gamma 2 [Homo sapiens]	303	0.99	4.39	18.9	13
40254462	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide [Homo sapiens]	88	0.99	1.29	27	8
5031703	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein [Homo sapiens]	592	0.99	2.34	31.3	11
166795299	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 [Homo sapiens]	516	0.99	7.20	11.2	7
33239445	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa [Homo sapiens]	659	0.98	13.51	26.4	16

	sapiens]					
6678271	TAR DNA binding protein [Homo sapiens]	374	0.98	3.85	23.7	7
50428938	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 [Homo sapiens]	222	0.98	9.27	32.8	7
166235148	osteoclast stimulating factor 1 [Homo sapiens]	144	0.98	10.86	33.2	5
19923399	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2 isoform a [Homo sapiens]	252	0.98	11.18	31.3	14
15055539	ribosomal protein S2 [Homo sapiens]	2813	0.97	11.42	33.8	10
4759302	VAMP-associated protein B/C [Homo sapiens]	308	0.97	8.13	24.3	5
21361399	alpha isoform of regulatory subunit A, protein phosphatase 2 [Homo sapiens]	753	0.97	12.59	39.9	18
15431290	ribosomal protein L11 [Homo sapiens]	319	0.97	6.33	34.3	6
50593002	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' [Homo sapiens]	280	0.96	13.36	36.9	11
17986258	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle isoform 1 [Homo sapiens]	489	0.96	8.16	51	8
7661678	RAP1B, member of RAS oncogene family [Homo sapiens]	4317	0.96	2.39	39.7	9
17158044	ribosomal protein S6 [Homo sapiens]	1308	0.96	16.82	37.8	11
54607053	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 [Homo sapiens]	1028	0.96	2.13	23	44
20070125	prolyl 4-hydroxylase, beta subunit precursor [Homo sapiens]	770	0.95	19.48	44.9	19
54607135	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A [Homo sapiens]	82	0.95	8.99	21.7	12
12667788	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle [Homo sapiens]	7194	0.95	13.58	46.7	89
10880989	RAB18, member RAS oncogene family [Homo sapiens]	186	0.95	2.30	40.3	6
15431288	ribosomal protein L10a [Homo sapiens]	2175	0.95	9.35	30.9	11
4506003	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1 [Homo sapiens]	335	0.95	3.84	22.1	6
4506685	ribosomal protein S13 [Homo sapiens]	875	0.94	14.49	55	8
91208426	U5 snRNP-specific protein [Homo sapiens]	1559	0.94	9.40	35.9	73
24430151	proteasome 26S ATPase subunit 1 [Homo sapiens]	601	0.94	3.55	51.6	19
4507125	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B/B' isoform B [Homo sapiens]	549	0.94	5.59	35.9	10
19743813	integrin beta 1 isoform 1A precursor [Homo sapiens]	210	0.94	14.20	19.5	11

116812573	CWC15 homolog [Homo sapiens]	93	0.93	0.57	29.3	6
4506607	ribosomal protein L18 [Homo sapiens]	856	0.93	5.11	47.9	11
190358517	RAB11B, member RAS oncogene family [Homo sapiens]	865	0.93	9.36	60.1	13
71773329	annexin VI isoform 1 [Homo sapiens]	548	0.93	12.95	34.9	24
217272892	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 isoform a [Homo sapiens]	1357	0.92	16.24	42	32
108773793	glucose-6-phosphate dehydrogenase isoform b [Homo sapiens]	191	0.92	16.49	29.9	16
20127408	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor [Homo sapiens]	255	0.92	17.22	20.2	14
7305503	stomatin (EPB72)-like 2 [Homo sapiens]	765	0.92	15.06	28.1	8
4506663	ribosomal protein L8 [Homo sapiens]	253	0.92	8.18	49.8	11
58761486	chaperonin containing TCP1, subunit 3 isoform b [Homo sapiens]	580	0.91	7.39	43.2	22
151301228	formin binding protein 3 [Homo sapiens]	192	0.90	3.34	14.2	12
4758950	peptidylprolyl isomerase B precursor [Homo sapiens]	1277	0.90	7.89	38.9	10
8922712	septin 11 [Homo sapiens]	187	0.90	3.53	25.9	9
171906582	coiled-coil domain containing 47 [Homo sapiens]	304	0.90	8.48	34.8	11
21626466	matrin 3 [Homo sapiens]	644	0.89	4.30	27.7	17
5031635	cofilin 1 (non-muscle) [Homo sapiens]	541	0.89	3.62	22.3	3
38569421	ATP citrate lyase isoform 1 [Homo sapiens]	284	0.89	10.46	21	18
4502643	chaperonin containing TCP1, subunit 6A isoform a [Homo sapiens]	1122	0.88	5.23	38.6	19
116875765	tight junction protein 1 isoform b [Homo sapiens]	291	0.88	6.01	13.8	18
4501885	beta actin [Homo sapiens]	2830	0.88	10.51	61.9	16
27436948	lamin A/C isoform 3 [Homo sapiens]	348	0.88	5.15	38	25
4506609	ribosomal protein L19 [Homo sapiens]	405	0.88	2.92	32.1	8
7657581	solute carrier family 25, member 13 isoform 2 [Homo sapiens]	1041	0.88	14.68	27.9	19
54112117	splicing factor 3b, subunit 1 isoform 1 [Homo sapiens]	578	0.88	16.74	31.3	33
39725636	transmembrane emp24 protein transport domain containing 9 [Homo sapiens]	257	0.87	9.23	40.4	8
16753227	ribosomal protein L6 [Homo sapiens]	239	0.86	1.71	25	10
89276756	serine/threonine-protein kinase PRP4K [Homo sapiens]	395	0.86	12.72	22.9	21
17999541	vacuolar protein sorting 35 [Homo sapiens]	531	0.86	15.35	32.7	22
31711992	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	187	0.86	19.12	16.7	11

	[Homo sapiens]					
116063573	filamin A, alpha isoform 1 [Homo sapiens]	777	0.86	14.71	24.3	43
73486658	aspartate aminotransferase 2 precursor [Homo sapiens]	1386	0.86	8.77	36.7	15
108773810	leucyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	502	0.85	8.60	16.3	16
4826998	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) [Homo sapiens]	647	0.85	5.78	27.7	17
77404397	staphylococcal nuclease domain containing 1 [Homo sapiens]	933	0.85	13.75	37.1	29
4506675	ribophorin I precursor [Homo sapiens]	158	0.85	4.35	18	9
110671329	dihydrolipoamide branched chain transacylase precursor [Homo sapiens]	293	0.85	3.26	26.3	13
21735621	mitochondrial malate dehydrogenase precursor [Homo sapiens]	6568	0.84	13.61	45.6	12
4826686	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1 [Homo sapiens]	251	0.84	9.28	20.4	11
62414289	vimentin [Homo sapiens]	8333	0.84	12.97	59.2	30
25188179	voltage-dependent anion channel 3 isoform b [Homo sapiens]	525	0.84	7.89	38.9	9
40018640	parafibromin [Homo sapiens]	356	0.84	5.04	34.3	15
4506193	proteasome beta 1 subunit [Homo sapiens]	403	0.83	0.23	48.5	9
41393608	reticulon 3 isoform b [Homo sapiens]	261	0.83	13.41	8	8
63252886	prolyl 4-hydroxylase, alpha I subunit isoform 1 precursor [Homo sapiens]	227	0.83	5.70	26.2	11
94721354	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 precursor [Homo sapiens]	157	0.83	7.26	22.9	7
14389309	tubulin alpha 6 [Homo sapiens]	993	0.83	18.24	44.1	13
94429050	SEC22 vesicle trafficking protein homolog B [Homo sapiens]	1031	0.83	8.86	43.3	8
21361657	protein disulfide-isomerase A3 precursor [Homo sapiens]	536	0.83	13.63	23.6	15
42476281	voltage-dependent anion channel 2 [Homo sapiens]	1088	0.82	11.88	41.2	9
9910280	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 [Homo sapiens]	834	0.82	8.63	17.8	24
22095331	hypothetical protein LOC23065 [Homo sapiens]	327	0.81	2.89	18.3	16
5031777	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha precursor [Homo sapiens]	1043	0.81	11.87	36.9	9
4502285	ATPase, Ca++ transporting, slow twitch 2 isoform 2 [Homo sapiens]	1339	0.81	6.49	32.4	27
19923437	adenylate kinase 3 [Homo sapiens]	128	0.81	9.19	30	6
28178821	isocitrate dehydrogenase 3, beta subunit isoform a precursor [Homo sapiens]	809	0.80	6.38	37.9	12

	sapiens]					
11345462	signal peptidase complex subunit 3 [Homo sapiens]	207	0.79	5.04	33.3	4
4506189	proteasome alpha 7 subunit [Homo sapiens]	302	0.78	4.32	36.3	8
10835073	N-myristoyltransferase 1 [Homo sapiens]	572	0.78	2.47	32.3	11
6631095	minichromosome maintenance complex component 3 [Homo sapiens]	165	0.78	1.43	25.5	16
4502303	mitochondrial ATP synthase, O subunit precursor [Homo sapiens]	291	0.78	13.49	16.9	4
4757756	annexin A2 isoform 2 [Homo sapiens]	5851	0.77	16.90	53.1	20
21361114	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11 [Homo sapiens]	708	0.76	13.39	43.9	12
29568103	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa [Homo sapiens]	160	0.76	4.68	24.5	11
4557403	carnitine/acylcarnitine translocase [Homo sapiens]	115	0.76	13.28	11	4
4506901	splicing factor, arginine/serine-rich 3 [Homo sapiens]	631	0.75	15.98	51.2	9
4506725	ribosomal protein S4, X-linked X isoform [Homo sapiens]	5275	0.75	16.04	60.8	19
4758032	coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime) [Homo sapiens]	291	0.75	3.02	24.6	16
224589127	transmembrane protein 33 [Homo sapiens]	154	0.75	13.53	37.7	8
4504897	karyopherin alpha 2 [Homo sapiens]	32	0.75	14.94	16.3	5
24797095	pyrroline-5-carboxylate reductase 1 isoform 2 [Homo sapiens]	164	0.75	8.83	28.5	7
4504253	H2A histone family, member X [Homo sapiens]	579	0.75	17.36	27.3	3
4506597	ribosomal protein L12 [Homo sapiens]	217	0.75	4.41	15.2	2
23397696	copine I isoform a [Homo sapiens]	665	0.74	17.99	29.9	10
31621305	leucine-rich PPR motif-containing protein [Homo sapiens]	194	0.74	13.04	19.2	25
5032007	purine-rich element binding protein A [Homo sapiens]	340	0.73	9.46	49.1	11
4507879	voltage-dependent anion channel 1 [Homo sapiens]	13813	0.73	17.67	65.4	17
148596949	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 [Homo sapiens]	754	0.72	15.85	17	10
106049292	pyruvate carboxylase precursor [Homo sapiens]	1280	0.72	13.87	30.2	31
33356547	minichromosome maintenance complex component 2 [Homo sapiens]	850	0.72	19.09	31.9	24
20149598	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10 [Homo sapiens]	124	0.71	3.73	13.6	4
5453740	myosin, light chain 12A, regulatory,	646	0.71	11.64	50.9	9

	non-sarcomeric [Homo sapiens]					
4505145	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial [Homo sapiens]	244	0.71	2.27	22.8	11
7657609	SEC11-like 1 [Homo sapiens]	147	0.71	14.89	35.8	6
8922601	ADP-ribosylation factor-like 10C [Homo sapiens]	366	0.71	3.45	40.9	6
55749577	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4 [Homo sapiens]	4345	0.71	4.82	42.6	16
6005854	prohibitin 2 isoform 2 [Homo sapiens]	4903	0.70	19.12	55.2	14
6005731	calcium binding protein P22 [Homo sapiens]	190	0.70	1.05	65.1	10
62420877	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide isoform 2 [Homo sapiens]	141	0.70	9.61	20.2	9
4507677	heat shock protein 90kDa beta, member 1 [Homo sapiens]	996	0.69	15.76	36.1	29
91199540	dihydrolipoamide dehydrogenase precursor [Homo sapiens]	121	0.69	15.81	18.3	8
41322923	plectin 1 isoform 11 [Homo sapiens]	2062	0.68	11.79	26.3	110
32171186	B-cell receptor-associated protein 31 isoform b [Homo sapiens]	269	0.67	4.78	27.6	8
148922911	ninjurin 1 [Homo sapiens]	201	0.67	2.90	20.4	2
21389315	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1 precursor [Homo sapiens]	208	0.67	10.91	31.2	10
5453549	peroxiredoxin 4 [Homo sapiens]	376	0.67	10.56	26.6	8
162417971	signal peptidase complex subunit 2 homolog [Homo sapiens]	417	0.67	4.43	42.5	6
5453832	hypoxia up-regulated 1 precursor [Homo sapiens]	1832	0.66	10.73	25.3	23
34147513	RAB7, member RAS oncogene family [Homo sapiens]	1594	0.66	17.40	72.9	15
4504041	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 [Homo sapiens]	865	0.66	0.31	30.7	10
169404009	signal sequence receptor, alpha [Homo sapiens]	1958	0.66	11.46	11.9	3
4507789	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 isoform 1 [Homo sapiens]	582	0.66	8.52	24	2
19923193	heat shock 70kD protein binding protein [Homo sapiens]	94	0.65	5.05	13	4
52630440	FK506-binding protein 8 [Homo sapiens]	183	0.64	7.95	11.6	3
5803013	endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	546	0.64	8.66	34.5	7
4758504	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 isoform 1 [Homo sapiens]	7218	0.64	13.18	29.9	6
4503971	GDP dissociation inhibitor 1 [Homo sapiens]	503	0.64	3.68	32.2	10

	sapiens]					
75677353	AAA-ATPase TOB3 [Homo sapiens]	434	0.64	6.35	20.1	12
56243533	stromal cell-derived factor 2-like 1 precursor [Homo sapiens]	252	0.63	6.80	14.9	2
4557233	short-chain acyl-CoA dehydrogenase precursor [Homo sapiens]	327	0.63	1.12	20.9	8
8923390	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3 [Homo sapiens]	168	0.63	4.87	27.8	8
155722983	TNF receptor-associated protein 1 [Homo sapiens]	500	0.63	4.99	33.9	21
4757732	programmed cell death 8 isoform 1 [Homo sapiens]	320	0.62	16.23	16.6	8
36796743	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like [Homo sapiens]	179	0.62	6.64	13.4	10
21361621	phosphoglucomutase 1 [Homo sapiens]	250	0.62	4.82	17.8	7
4885409	high density lipoprotein binding protein [Homo sapiens]	442	0.62	0.75	30.9	29
4505773	prohibitin [Homo sapiens]	2110	0.60	17.94	6108	14
74136552	mesoderm development candidate 2 [Homo sapiens]	354	0.60	15.94	33.3	6
5902076	splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 1 [Homo sapiens]	857	0.59	1.83	54.4	15
25777732	mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 precursor [Homo sapiens]	672	0.59	2.17	28	13
5031973	protein disulfide isomerase A6 [Homo sapiens]	1119	0.59	16.31	33.6	13
19923483	GTPase Rab14 [Homo sapiens]	836	0.58	14.81	58.1	9
5729875	progesterone receptor membrane component 1 [Homo sapiens]	672	0.57	12.31	20.5	6
41327685	basic FGF-repressed Zic binding protein isoform a [Homo sapiens]	179	0.57	9.37	24.4	7
16507237	heat shock 70kDa protein 5 [Homo sapiens]	6551	0.57	19.91	41	25
5453916	progesterone receptor membrane component 2 [Homo sapiens]	209	0.56	6.98	35.9	8
21361181	Na+/K+ -ATPase alpha 1 subunit isoform a [Homo sapiens]	2472	0.54	0.09	30.5	26
7657347	mitochondrial carrier 2 [Homo sapiens]	511	0.54	17.91	23.1	6
7019415	Sec61 alpha 1 subunit [Homo sapiens]	82	0.54	0.52	7.6	4
31542947	chaperonin [Homo sapiens]	4497	0.53	8.34	52.5	28
56550051	ubiquitin specific protease 39 [Homo sapiens]	186	0.52	6.36	25.5	9
33469968	minichromosome maintenance complex component 7 isoform 1 [Homo sapiens]	193	0.52	2.75	23.9	13
7705726	thioredoxin domain containing 14	156	0.52	16.43	22	5

	isoform 1 [Homo sapiens]					
7706495	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11 precursor [Homo sapiens]	530	0.51	8.10	40.2	10
72534660	splicing factor, arginine/serine-rich 7 [Homo sapiens]	880	0.49	18.25	25.2	6
8923415	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5 [Homo sapiens]	188	0.49	1.95	27.7	7
18375673	regulator of nonsense transcripts 1 [Homo sapiens]	543	0.47	4.82	19.1	14
38569475	metaxin 1 isoform 1 [Homo sapiens]	167	0.47	2.68	8.6	3
4757900	calreticulin precursor [Homo sapiens]	1125	0.46	12.88	26.6	10
24308133	transmembrane and coiled-coil domains 1 [Homo sapiens]	353	0.46	15.52	25	4
20149568	NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 1 precursor [Homo sapiens]	129	0.45	13.82	28	14
11863154	archain isoform 1 [Homo sapiens]	307	0.43	7.87	42.3	21
4506365	RAB2A, member RAS oncogene family [Homo sapiens]	702	0.22	8.32	59	10

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD
INDUCIDA POR MeHg EN PEZ CEBRA**

S. Cuello, P. Ximénez-Embún, I. Ruppen, H. B. Schonhaler, Keith Ashman, Y. Madrid,
J.L. Luque-García, C. Cámara

“Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in
zebrafish”

Analyst, 2012, 137, 5302-5311

Parte de este trabajo fue presentado como comunicación oral en:

“Proteomlux 2010”, Julio, 2010.

Parte de este trabajo fue presentado como poster en:

“13as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Noviembre, 2011.

A parte de este trabajo le fue concedido un premio por la Sociedad Española de
Química Analítica (SEQA) en:

“13as Jornadas de Análisis instrumental”, Barcelona, España, Noviembre, 2011.

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 5302

www.rsc.org/analyst

PAPER

Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish†

Susana Cuello,^a Pilar Ximénez-Embún,^b Isabel Ruppen,^b Helia B. Schonthaler,^c Keith Ashman,^d Yolanda Madrid,^a Jose L. Luque-García^{*a} and Carmen Cámara^{*a}

Received 5th July 2012, Accepted 12th September 2012

DOI: 10.1039/c2an35913h

Mercury toxicity and its implications in development are a major concern, due to the major threat to ecosystems and human health that this compound represents. Although some of the effects of methylmercury (MeHg) exposure have been extensively studied, the molecular mechanisms of interaction between this compound and developing organisms are still not completely understood. To provide further insights into these mechanisms, we carried out a quantitative proteomic study (iTRAQ) using zebrafish larvae exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg as a model. In this study, a multidimensional approach combining isoelectric focusing (IEF) and strong cation exchange (SCX) followed by reversed phase liquid chromatography prior to MALDI TOF/TOF analysis was employed, which resulted in a substantial increase in proteome coverage. Among the proteins identified, 71 were found de-regulated by more than 1.5-fold, and implicated in embryonic development, protein synthesis, calcium homeostasis and energy production. Furthermore, morphological and histological analysis of exposed larvae was carried out, reflecting changes such as smaller swim bladder, remaining yolk, bent body axis and accumulation of blood in the heart, among others.

Introduction

Toxicity, biochemical behavior and transport of mercury in the environment are clearly dependent on its chemical form.¹ Inorganic mercury (Hg^{2+}) and monomethylmercury (CH_3Hg^+) are the two most abundant species found in biological samples.² It is well known that organomercurial compounds are more harmful than inorganic mercury; however, the latter can also be biomethylated by aquatic organisms, thus making fish consumption the major source of methylmercury for humans.³ Application of the bioconcentration test 305 (proposed as a standard method by the OECD to adult fish exposed to methylmercury) has demonstrated the high capacity of this compound to be accumulated.⁴ Although the bioconcentration factor provides valuable information about the bioaccumulative properties of a chemical, additional information on the mechanisms of interaction and the effects caused in living organisms are required to

evaluate the toxicity of a given compound. In our case, it is known that ingested mercury can interact with proteins and enzymes due to its strong affinity for sulfur, causing organ dysfunction and a devastating effect on the whole central nervous system, particularly the developing brain.⁵ The generation of reactive oxygen species (ROS) by MeHg as well as the active involvement of the mitochondria in the process have been shown in previous studies.^{6,7} Specific proteins and mechanisms related to methylmercury-induced cell death⁷ and neurotoxicity^{8,9} have also been reported using different biochemical approaches. However, a deeper insight into the mechanisms by which methylmercury exerts its toxicity, particularly during embryonic development, would be highly desired.

Quantitative proteomics appears as a suitable tool for this purpose since hundreds of proteins can be analyzed in a single experiment,¹⁰ thus allowing the identification of those with an altered expression induced by MeHg. These proteins would represent not only potential targets for the study of specific mechanisms by additional biochemical methods, but also as potential biomarkers of MeHg ecotoxicity. The application of advanced proteomic strategies to the toxicological field has been very discrete so far; although in other fields, quantitative proteomics is emerging as a reference exploratory technique.^{11,12} As for the study of MeHg-induced toxicity, proteomics has only been applied using gel-based approaches,^{13,14} which have important limitations regarding the number of potential identifications.

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: jlluque@quim.ucm.es; ccamara@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329; Tel: +34 913944318

^bProteomics Core Unit, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain

^cBBVA Foundation – CNIO Cancer Cell Biology Programme, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain

^dUQ Centre for Clinical Research, Building 71/918 RBWH, Herston, QLD 4029, Australia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2an35913h

Based on all of the above, we have selected a state-of-the-art quantitative proteomic approach as a discovery strategy, that circumvents the limitations of gel-based proteomic approaches, in order to identify target proteins associated with the mechanisms involved in the developmental toxicity induced by MeHg as well as potential biomarkers of ecotoxicity. iTRAQ¹⁵ (isobaric tags for relative and absolute quantification) was used as the unbiased quantitative proteomic approach in this study. This method allows isotopic labeling of different tissue samples and thus, protein quantitation of up to 8 samples simultaneously in a single experiment.¹⁶ The use of bioinformatic tools also allowed us to identify the biological processes and functions affected upon MeHg exposure. We have selected zebrafish larvae as a model since it has been recently proposed as an alternative to adult fish in the previous OECD test guideline because of the drastic time reduction in the bioaccumulation test (72 hours vs. 42 days when using adult fish) and other additional advantages such as (i) sample availability (each female is capable of laying 200–300 eggs per week), (ii) fast embryonic development and (iii) a high similarity on the protein level compared to humans (mostly protein homology is above 70%). This makes it a very suitable model for proteomic analysis of MeHg effects in vertebrates.

In our work, we have evaluated changes in the proteome of zebrafish larvae exposed to 5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg as compared to control samples. The criteria for selecting 5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposure concentrations is based on previous experiments done by increasing MeHg levels of exposure. The selected levels allow the observation of changes in the zebrafish embryo within a reasonable time for the assay and without promoting mortality among zebrafish embryo (A LC50 of 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ has been reported for MeHg for zebrafish embryo).¹⁷ The results obtained from the proteomic approach, have been supported by morphological and histological analysis carried out on the MeHg-exposed larvae; thus helping to gain a deeper insight into the developmental toxicity induced by MeHg.

Materials and methods

Sample preparation

Zebrafish (*Danio rerio*) larvae (WIK strain) were kindly provided by the Spanish National Cardiovascular Research Center (CNIC, Madrid, Spain). Exposure media were prepared in order to have a similar composition to fresh river water, containing 46.4 mg L^{-1} of CaCl_2 , 275.2 mg L^{-1} of NaCl, 12.2 mg L^{-1} of KCl and 78.4 mg L^{-1} of MgSO_4 . Based on OECD guidelines, the culture conditions in this medium were: 26 ± 2 °C, dissolved oxygen $\geq 60\%$ and pH 6–8.5 (before and after renewal). MeHgCl standard solutions used for exposure tests were prepared in culture media daily by making appropriate dilutions of MeHgCl stock standard solution at 1000 mg L^{-1} prepared in methanol. The stock solution was stored in the dark at -18 °C. Zebrafish larvae at 72 h post-fertilization (hpf) were exposed to MeHg for 72 hours in Petri dishes containing different concentrations of MeHg (0 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$), after which the larvae (6 days post-fertilization – 6 dpf) were collected and prepared for the proteomic study or for the microscopic and histological analysis. To avoid potential variability associated with the use of

different Petri dishes for each condition, the samples used were pools of larvae grown in different dishes. Concentrations of MeHg in larvae after 72 h of exposure were estimated applying the bioaccumulation factor (BCF) previously calculated by ICP-MS in similar samples at similar exposure times.⁸ Considering a BCF value of 2500, the concentration of MeHg in larvae should be around 12.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 62 $\mu\text{g g}^{-1}$, for larvae exposed to 5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

Protein extraction and peptide labeling

Zebrafish larvae (20 per condition) were resuspended in 200 μL of ice-cold RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 37 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS and 0.5% Na deoxycholate) containing protease and phosphatase inhibitors. Samples were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 4 °C and 16 000g for 10 min. This step was repeated twice and supernatants containing the protein fraction were cleaned-up by acetone precipitation with six volumes of ice-cold acetone. Pellets were dissolved in 0.5 M triethylammonium bicarbonate (TEAB). For the 4-plex iTRAQ experiments, zebrafish larvae from the same genetic background (WIK, wild type strain previously established) were either used as controls or exposed to 5 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg for 72 hours. Biological replicates were carried out with larvae from different matings at different times and in different Petri dishes. Protein concentration was determined by the Bradford assay using BSA as standard. Protein digestion and iTRAQ labeling was performed according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems) and as described elsewhere.¹⁸ Each tryptic digest was labeled with one isobaric amine-reactive tag as follows: Tag₁₁₄ – Control 1, Tag₁₁₅ – Control 2, Tag₁₁₆ – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg and Tag₁₁₇ – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg. Labeling was done in two sets of samples in order to obtain two biological replicates (A and B).

Strong cation exchange and OFFGEL fractionation

One half of the sample, equivalent to 50 μg of protein was separated by strong cation exchange chromatography (SCX) as in previous studies.¹⁹ pI-based peptide separation was performed by a 3100 OFFGEL Fractionator System (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) with a 24-well set-up. The 24 cm long IPG gel strips (GE Healthcare, München, Germany) with a 3–10 linear pH range were rehydrated for 15 min with the Peptide IPG Strip Rehydration Solution according to the manufacturer's protocol. Subsequently, 150 μL of the sample was loaded in each well. Isoelectric focusing (IEF) of the peptides was performed at 20 °C and 50 μA until the 50 kV h level was reached. After focusing, the 24-peptide fractions were withdrawn and the wells rinsed with 100 μL of a solution of water–methanol–formic acid (49/50/1). Rinsing solutions were pooled after 15 min with their corresponding peptide fractions. All fractions were evaporated by centrifugation under vacuum and reconstituted in 0.1% TFA 3% ACN prior to clean up. Solid phase extraction and salt removal was performed with home-made columns based on Stage Tips with C8 Empore Disks (3M, Minneapolis, MN) filled with R2 resin (Applied Biosystems). The bound peptides were washed with 0.1% TFA and eluted with 0.1% TFA 70% ACN. Eluates were evaporated to dryness and maintained at 4 °C.

Reversed-phase liquid chromatography

Each fraction from the SCX or IEF separation was resuspended in 0.1% TFA 3% ACN buffer and separated on an Ultimate 3000 nano-LC system (Dionex-LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) equipped with a Probot™ MALDI spotting device (Dionex-LC Packings). In order to pre-concentrate and desalt the samples before switching the pre-column in line with the separation column, 20 μL from each dissolved SCX and IEF fraction was loaded onto a reversed-phase Monolithic PS-DVB 200 μm ID \times 5 mm peptide trapping cartridge (Dionex-LC Packings), and washed for 8 min at 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ with loading buffer (0.05% HFBA). The peptides were eluted from a RP Monolithic PS-DVB column 200 μm ID \times 5 cm analytical column (Dionex-LC Packings) by application of a binary gradient with a flow rate of 2.5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Buffer A was 2% ACN in 0.05% TFA, buffer B was 50% ACN with 0.04% TFA. The gradient used was 0–8 min 0% B, 8–39 min 65% B, 39–45 min 90% B and 45–55 min 0% B. For IEF fractions, 2% of buffer B was used during the washing step and column equilibration. The column effluent was mixed directly with the MALDI matrix solution (3 mg mL^{-1} α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 70% ACN with 0.1% TFA) at a flow rate of 2.5 $\mu\text{L min}^{-1}$ through a μ -Tee connection, before spotting onto 1664-well stainless steel MALDI target plates (Applied Biosystems) using a Probot micro fraction collector (Dionex-LC Packings) with a speed of 5 s per well. The matrix contained 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and 10 nmol of P14R synthetic peptide (monoisotopic $(M + H)^+ = 1533.8582$; $\text{C}_{76}\text{H}_{113}\text{N}_{18}\text{O}_{16}$) (Sigma, St. Louis, MO, USA) as an internal standard for mass calibration.

Protein identification and quantification by mass spectrometry

MALDI target plates were analyzed using a 4800 Analyzer equipped with TOF/TOF ion optics (ABSCIEX, Concord, Ontario, Canada), and 4000 Series Explorer software version 3.5.1, as described elsewhere.¹⁸ Protein identification and relative quantification were performed with the ProteinPilot™ software (version 3.0; ABSCIEX) using the Paragon™ algorithm as described in detail in the ESI† “Protein ID/QT Methods”. Precursor and fragment ion mass tolerance were set to 0.2 and 0.4 Da, respectively. The results were then exported into Excel for manual data interpretation. Although relative quantification and statistical analysis were provided by the ProteinPilot 3.0 software, an additional 1.5-fold change cutoff for all iTRAQ ratios was selected to classify proteins as up- or down-regulated.

Statistical analysis

The relative protein levels between the iTRAQ-labeled samples were estimated based on the quantitative ratios. The average ratio for each protein was calculated by ProteinPilot™ based on the ratio values for each peptide. These values were determined based on the peak area ratios on the MS/MS spectra between ions m/z 114.1, 115.1, 116.1 and 117.1 (corresponding to the different iTRAQ tags). ProteinPilot™ also provided the P -value for each protein, which measures the certainty that the average ratio differs from 1. The smaller the P -value, the more likely any differential expression observed is real. Proteins showing a P -value < 0.05 were considered de-regulated by the ProteinPilot™ software. However,

in our experiment, an additional cut-off of 1.5-fold change was selected due to the variability associated with our samples. Further details on the statistical analysis are given in the ESI.†

Bioinformatic-based functional analysis

Protein ID mapping was carried out by the web-free application Protein Identifiers Cross-Reference (PICR) to establish the cellular localization, the biological function and the biological process in which the identified proteins are involved based on Gene Ontology annotations. In order to know potential intracellular signaling pathways or molecules affected by MeHg exposure, the significantly de-regulated proteins with their NCBI accession number and the ratio changes were imported into the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software package (Ingenuity Systems Inc.).

Histological analysis

For histological analyses by light microscopy (LM), larvae were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.2) at 4 °C overnight and washed three times in PBS. The embryos were dehydrated in a standard ethanol series, infiltrated and embedded in paraffin for sectioning. For H&E staining, 5 μm sections were processed according to standard procedures.

Results and discussion

Combination of SCX and IEF increase proteome coverage

In this study, a multidimensional approach combining IEF and SCX followed by reversed phase liquid chromatography was used for extensive peptide separation (Fig. 1). A total number of 1189 and 1141 proteins were identified by ProteinPilot in biological replicates A and B, respectively, after the overall analysis of all spectra acquired in the study. For further analysis, only proteins identified with 2 or more distinct peptides were considered, resulting in 667 and 594 proteins identified in biological replicates A and B, respectively. A total of 442 identified proteins were common to both biological replicates, showing a significant overlap between samples (Fig. 2A).

Peptide fractionation combining IEF and SCX has been shown to increase protein identification over classic multidimensional approaches such as MudPIT, since three distinct separation techniques are employed. 484 and 350 proteins were identified in replicate A after the analysis of data obtained from SCX and IEF fractionation samples, respectively (Fig. 2B). In replicate B, 389 and 339 proteins were independently identified from SCX and IEF approaches (Fig. 2C). Hence, SCX provided more protein identifications, thus confirming that the degree of proteome coverage is proportional to the extent of peptide fractionation (ESI, Fig. S1†).¹⁹

Fig. 2B and C also show the overlapping of the fractionation techniques, since only 38% of all the proteins identified in replicate A and 35% of all the proteins identified in replicate B were detected using both approaches.

As a result, we can conclude that the number of proteins identified is significantly high after using complementary techniques for sample fractionation before RP separation, which is the ultimate goal of discovery-oriented experiments.

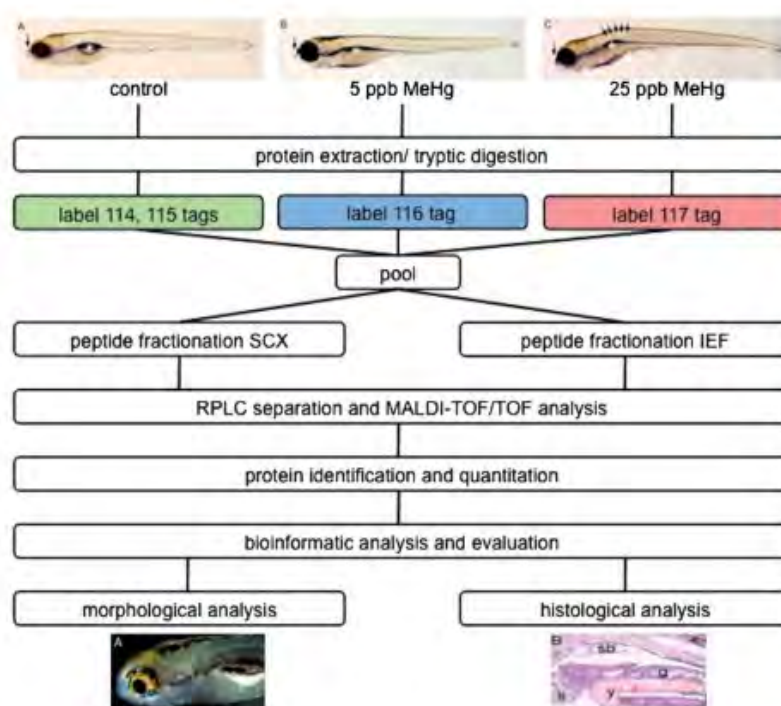


Fig. 1 General scheme of the discovery platform used based on iTRAQ in combination with SCX and IEF separation and MALDI-TOF/TOF analysis.

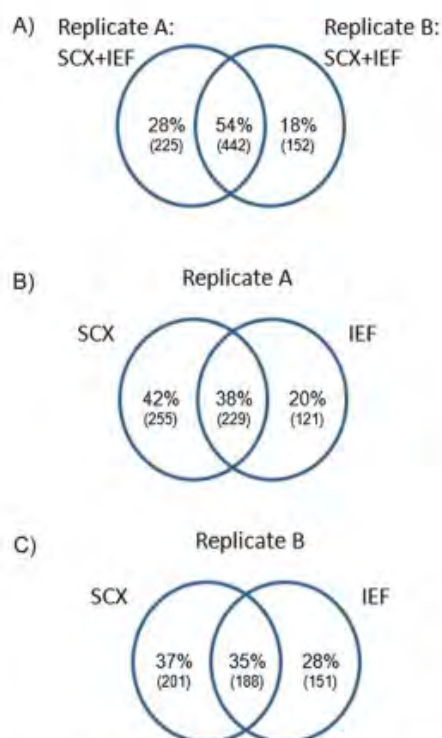


Fig. 2 Venn diagrams depicting the overlap of proteins (A) between replicate A and replicate B when combining spectra from SCX and IEF separations, (B) between SCX and IEF approaches in replicate A and (C) between SCX and IEF approaches in replicate B. Only proteins identified with two or more peptides with 95% confidence were considered.

Protein abundance changes upon MeHg exposure

We analysed the larval zebrafish proteome in two large-scale iTRAQ biological replicates (20 zebrafish larvae per condition). In these experiments control larvae were compared to larvae exposed to $5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $25 \mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg for 72 h. Altogether 819 proteins were identified in the two iTRAQ experiments with two or more unique peptides, which was the criteria considered for valid hits. Using 1.5 as the threshold for a significant fold change due to the expected heterogeneity of the samples, 18 proteins were found de-regulated upon $5 \mu\text{g L}^{-1}$ MeHg exposure, of which half of the proteins were up-regulated and the other half down-regulated (Table 1). As for the larvae exposed to $25 \mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg, we found 58 de-regulated proteins, from which 42 were up-regulated (Table 2) and 16 down-regulated (Table 3). Detailed information of the de-regulated proteins is provided as ESI (Tables S1 and S2†). As expected, the increase in MeHg concentration was directly correlated with the increase in the number of de-regulated proteins. However, the identified de-regulated proteins were significantly different between larvae treated with the two different MeHg concentrations, thus reflecting differences in the activation of different biological functions due to the treatment. This can be explained by the fact that our study was carried out on a developing organism, which means that the same organs and functions may be affected differently at different concentrations of MeHg due to the different needs of every organ at different developmental stages. These results correlate well with the morphological and histological changes observed (see below) under both conditions. Regarding the iTRAQ ratio distribution, most of the identified proteins were within an iTRAQ ratio close to 1, as expected for a 1 : 1 : 1 : 1 mixture.

Table 1 Proteins found de-regulated in 6 dpf zebrafish larvae exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg

Accession number (gi)	Common name	Protein name	Average iTRAQ ratio	iTRAQ ratio A	P-value A	Number of peptides A	iTRAQ ratio B	P-value B	Number of peptides B
47550733	serbp1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	2.91	NQ	NQ	NQ	2.91	0.018	5
18858587	cefla	Elongation factor 1-alpha	2.13	2.52	0.608	4	1.74	0.021	6
18858197	gstp1	Glutathione S-transferase pi ^a	1.76	1.70	0.002	8	1.82	0.004	6
18859297	pvalb2	Parvalbumin-2 ^a	1.68	1.65	0.001	5	1.71	0.011	4
157787181	ckmb	Muscle creatine kinase b	1.66	1.72	0.007	5	1.60	0.208	2
33636707	pvalb9	Parvalbumin 9 ^a	1.62	1.62	0.051	3	NQ	NQ	NQ
55742597	cif5a2	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	1.59	1.54	0.253	2	1.64	0.474	3
31795559	tnnt3b	Troponin T3b, skeletal, fast isoform 2	1.54	1.58	0.008	5	1.50	0.026	5
18858947	krt4	Keratin 4	1.54	1.67	0.014	7	1.41	0.979	4
113678458	vtg2	Vitellogenin 2 isoform 1	-1.54	-1.54	0.001	20	-1.54	0.001	23
156713467	vtg7	Vitellogenin 7	-1.56	-1.54	0.079	6	-1.58	0.014	10
68448530	vtg5	Vitellogenin 5	-1.56	-1.43	0.074	11	-1.69	0.001	15
189523697	ttmb	Titin b	-1.56	NQ	NQ	NQ	-1.56	0.037	6
303227889	vtg6	Vitellogenin 6	-1.59	-1.55	0.059	5	-1.63	0.008	9
68444085	mfp4	Microfibrillar-associated protein 4-like	-1.79	NQ	NQ	NQ	-1.79	0.026	2
66472252	smhcl	Slow myosin heavy chain 1	-1.85	-1.95	0.022	3	-1.75	0.045	7
189523699	ttna	Titin a ^a	-2.38	NQ	NQ	NQ	-1.32	0.359	6
238776848	myhz1.2	Myosin, heavy polypeptide 1.2 ^a	-3.85	-3.85	0.0020	11	NQ	NQ	NQ

^a Proteins de-regulated at both 5 and 25 ppb of MeHg exposure.

Functional analysis

The functional annotation of the 71 differentially expressed proteins in control vs. MeHg exposed larvae was assigned using the web-free application Protein Identifiers Cross-Reference (PICR) based on the Gene Ontology database. Three main types of annotations were obtained: the cellular compartment, the molecular function and the biological process (Fig. 3). A high number of de-regulated proteins (32%) were localized in the cytosol and the cytoskeleton, supporting the relevance of these compartments in the mechanisms involved in MeHg-induced toxicity (Fig. 3A). The ontology analysis indicated the relevance and diversity of molecular functions of these proteins, such as catalytic activity (34%), nucleotide binding (16%) and transport activity (11%) (Fig. 3B). The data in Fig. 3C are supported by previous studies on the impact of MeHg exposure^{11–13} since several biological processes that appeared to be de-regulated proteins include the metabolic process (32%), transport (14%) and response to stimulus (14%). Moreover, we identified processes that are closely related to methylmercury toxicity, such as developmental processes (4%) and apoptosis (9%). The data identifying de-regulated proteins were further analyzed using the IPA software to scrutinize for key biological processes and pathways of relevance regarding the mechanisms of toxicity associated with MeHg. In addition, the software was used to statistically rank the various pathways in order of significance. Therefore, 58 ID proteins were imported into the software and 38 were mapped by the knowledge database functions among those proteins included cellular assembly and organization, including formation of filaments (si:dkey-46g23.2, fn1b, krt18, pfn2l, ttmb), gastrointestinal disease, hepatic system disease including damage of liver (c3, krt18, krt8) and neurological disease, with

sub-functions such as movement disorders and neuromuscular diseases (si:dkey-46g23.2, AK1, c3, gstp1, nme2b.1, pfn2l, rpia, uchl1). The most relevant functions associated with the top network generated from the analysis (ESI, Fig. S2†) include cellular assembly and organization; cellular function and maintenance; and cellular movement. These data are consistent with the morphological and histological alterations observed in exposed larvae, and with the well-known neurotoxic^{20–22} and hepatotoxic^{7,23} properties of MeHg.

In order to correlate both the proteomic results and the histological observations with the functional analysis, we used the databases ZFIN (<http://zfin.org>)²⁴ and ZF-Espresso (<http://zf-espresso.tuebingen.mpg.de/>). These repositories contain *in situ* hybridization studies showing organ-specific expression patterns. References supporting the organ-specific location of proteins found deregulated upon MeHg exposure are included as ESI (Table S3†).

Histological analysis

6 dpf control larvae showed the typical developmental morphology at this developmental stage (Fig. 4A), whereas 6 dpf zebrafish larvae exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4B) and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4C) showed a significantly smaller swim bladder (not macroscopically visible) (ESI, Fig. S3†) and a morphological change of the upper jaw (flattening of the anterior part), this was more pronounced in larvae exposed to the higher concentration. Moreover, these larvae showed a bent body axis above the trunk region (see arrows in Fig. 4C). Previous studies where embryos of fathead minnow,²⁵ killifish²⁶ and zebrafish²⁷ were exposed to different concentrations of Hg showed similar features including

Table 2 Up-regulated proteins in 6 dpf zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg

Accession number (gi)	Common name	Protein name	Average iTRAQ ratio	iTRAQ ratio A	P-value A	Number of peptides A	iTRAQ ratio B	P-value B	Number of peptides B
189521249		Hypothetical protein	15.10	16.28	0.025	4	13.92	0.136	4
24308537	zp2.4	Zona pellucida glycoprotein 2.4	7.44	NQ	NQ	NQ	7.44	0.029	9
47086603	si:dkcyp-50f7.2	ZPA domain containing protein isoform 2	7.76	7.76	0.017	7	NQ	NQ	NQ
41055329	chia	Acidic chitinase	6.04	6.42	0.009	5			1
94536701	si:dkcyp-50f7.2	ZPA domain containing protein isoform 1	6.04	NQ	NQ	NQ	6.04	0.011	5
125816799	si:dkcy-46g23.2	si:dkcy-46g23.2	5.83	7.58	0.004	3	4.08	0.003	5
61651682	fn1b	Fibronectin 1b	3.65	3.65	0.038	6	NQ	NQ	NQ
226442998	hclb	Hatching enzyme 1b	3.12	NQ	NQ	NQ	3.12	0.004	1
288856329	myhz1.1	Myosin, heavy polypeptide 1.1	3.05	2.85	0.008	13	3.25	0.001	4
238776848	myhz1.2	Myosin, heavy polypeptide 1.2 ^a	2.30	NQ	NQ	NQ	2.30	0.021	13
50355968	calrl	Calreticulin like	2.15	2.15	0.074	5	NQ	NQ	NQ
41054259	pdia4	Protein disulfide-isomerase A4	2.14	2.07	0.132	7	2.21	0.365	5
82658290	hmgb2	High-mobility group box 2	2.11	2.11	0.029	5	NQ	NQ	NQ
292610077	c3	Complement component 3	2.08	1.87	0.178	4	NQ	NQ	NQ
53749651	ppib	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase B	2.06	2.07	0.017	6	2.05	0.009	5
18858197	gstp1	Glutathione S-transferase pi ^a	2.05	1.91	0.002	8	2.19	0.209	6
18859107	nmc2b.1	Nucleoside diphosphate kinase A	2.01	1.94	0.005	4	2.08	0.087	4
125827065	si:dkcy-88116.3	si:dkcy-88116.3	1.98	1.98	0.039	2	NQ	NQ	NQ
33636707	pvalb9	Parvalbumin 9 ^a	1.95	1.97	0.230	3	1.93	0.346	3
292618718	vtg3	Vitellogenin 3, phosvitinless	1.86	1.86	0.006	19	NQ	NQ	NQ
40254675	lmbn1	Lamin-B1	1.84	1.84	0.406	5	NQ	NQ	NQ
189523699	ttna	Titin a ^a	1.83	NQ	NQ	NQ	1.83	0.592	6
82524272	c3b	Complement component c3b	1.81	NQ	NQ	NQ	1.81	0.005	2
189535920	fina	filamin A, alpha	1.80	2.07	0.002	19	1.53	0.758	16
41393111	uchl1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1.79	1.72	0.009	4	1.86	0.505	2
292619135	flnb	Filamin B, like, partial	1.78	NQ	NQ	NQ	1.78	0.009	3
30410758	krt18	Keratin, type I cytoskeletal 18	1.73	1.73	0.039	3	NQ	NQ	NQ
67972636	hnmpab	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	1.72	1.65	0.273	2	1.79	0.027	2
18859297	pvalb2	Parvalbumin-2 ^a	1.62	1.52	0.002	5	1.72	0.007	4
56118638	pfn2l	Profilin-2	1.62	1.62	0.005	2	NQ	NQ	NQ
41151982	mvp	Major vault protein	1.60	1.39	0.045	6	1.81	0.049	6
65301457	prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1.57	1.57	0.119	2	NQ	NQ	NQ
48597012	rpl23a	60S ribosomal protein L23a	1.57	1.44	0.034	3	1.70	0.005	1
41152461	rpl7a	60S ribosomal protein L7a	1.56	1.56	0.084	1	NQ	NQ	NQ
41386743	ccf2b	Eukaryotic translation elongation factor 2b	1.56	1.56	0.080	8	NQ	NQ	NQ
292611632	BX901973.4	Hypothetical protein LOC325896	1.56	1.44	0.043	4	1.68	0.007	5
68442739	his4r	Histone H4 replacement-like	1.55	1.48	0.096	5	1.62	0.003	2
41053774	crp44	Endoplasmic reticulum resident protein 44	1.54	1.54	0.226	3	NQ	NQ	NQ

^a Proteins de-regulated at both 5 and 25 ppb of MeHg exposure.

flexure of the embryonic axis,²⁵ increase of the spinal curvature²⁶ and abnormalities along the finfold,²⁷ which is consistent with the fact that some of the proteins found de-regulated in our study were located in the musculature system (ESI, Table S3†). Other organs such as brain, ear and liver seemed to be affected by MeHg exposure as compared to control larvae that showed typical developmental morphology (Fig. 4D). The fold between the telencephalon and the tectum was absent in larvae exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg and a slight hammerhead was observed (Fig. 4E). These changes were even more dramatic in the zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4F). In addition, in the larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg the shape of the ear was irregular and the liver size was increased. Proteins including *c3*, *gstp1*, *c3b* and *rhp4*, that are located in the liver showed an alteration in their

expression levels after MeHg exposure (ESI, Table S3†). Larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ also showed an accumulation of blood in the heart region (indicated by an arrow), thus suggesting a possible defect in the cardiac output (Fig. 4F). Devlin and Mottet²⁸ have previously observed that embryos exposed to MeHg presented abnormalities associated with the circulatory system: the heartbeat was irregular and blood could not make a complete circuit through the heart without difficulty. This observation may be related to the overexpression suffered by the nucleoside diphosphate kinase A, located in the heart, upon MeHg exposure (ESI, Table S3†).

Morphological and histological analyses of the eye did not reveal obvious changes after treatment with either 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ or 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg (ESI, Fig. S4†). 6 dpf old zebrafish larvae under

Table 3 Down-regulated proteins in 6 dpf zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg

Accession number (gi)	Common name	Protein name	Average iTRAQ ratio	iTRAQ ratio A	P-value A	Number of peptides A	iTRAQ ratio B	P-value B	Number of peptides B
41152439	rpl10a	60S ribosomal protein L10a	-1.49	-1.49	0.055	3	NQ	NQ	NQ
71834286	apobl	Apolipoprotein B, like	-1.54	-1.44	0.142	46	-1.64	0.242	47
292619319	rbp4	Retinol-binding protein 4, plasma-like	-1.54	NQ	NQ	NQ	-1.54	0.014	2
45387573	pvalb1	Parvalbumin isoform 1d	-1.54	-1.58	0.037	3	-1.50	0.036	2
51571925	AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1	-1.56	-1.54	0.063	4	-1.58	0.229	3
48762657	eno1	Alpha-enolase	-1.59	NQ	NQ	NQ	-1.59	0.009	2
54261787	ilf2	Interleukin enhancer-binding factor 2	-1.61	-1.72	0.163	3	-1.50	0.054	5
292617604	crygc	Crystallin, gamma C-like	-1.64	-1.50	0.219	1	-1.69	0.017	2
18858425	krt5	Keratin 5	-1.67	NQ	NQ	NQ	-1.67	0.011	3
41054746	gatm	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	-1.69	-1.69	0.106	2	NQ	NQ	NQ
47550793	nnt	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	-2.08	-2.08	0.109	4	NQ	NQ	NQ
33504543	atp6v1ba	V-type proton ATPase subunit B	-2.13	NQ	NQ	NQ	-2.13	0.065	2
62632719	hbbe3	Hemoglobin beta embryonic-3	-2.22	-2.32	0.049	4	-2.12	0.033	3
27545277	ceflg	Elongation factor 1-gamma	-2.44	-2.08	0.084	6	-2.80	0.127	7

incident light conditions showed the typical pattern and intensity of iridophores in the eye and in the body. Shape and size of the eye was found to be wild-type-like (ESI, Fig. S4a†). 6 dpf zebrafish larvae exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg displayed a slight reduction of iridophores in the eye (ESI, Fig. S4c and S4f†) and in the body. However, no differences in melanocyte pigmentation or melanin distribution were observed (data not shown). Furthermore, no difference in shape and size of the eye or the pupil were detected in MeHg exposed larvae as compared to controls. This was confirmed by histological analyses (data not shown).

Zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ displayed a significantly smaller swim bladder (sb) (Fig. 5). The remaining yolk (y) at this age indicated a developmental delay of the exposed larvae, which is also supported by previous studies where a delay in development was observed due to MeHg and HgCl_2 treatment.^{28–30} Liver (li) cells showed increased vesicular areas which might indicate an increased liver cell size and disturbed liver cell function (Fig. 5B). The inset in B shows a magnification of the gut (g) where cells containing big vacuoles appeared after exposure. Zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ developed a defect in the myotomes as well as in the notochord (Fig. 5D). Myotomes were smaller in size and the boundaries in-between somites were hardly visible. Myofibers within the myotomes appeared to be loosely packed. The high magnification of the notochord (insert in Fig. 5D) showed a defect in the palisade-like structures of the chondrocytes reflecting the bend body-axis (see also arrows in Fig. 4C). The chondrocytes of the notochord were also affected in coho salmon embryos exposed to MeHg in the study carried out by Devlin and Mottet.²⁸ These dysfunctions probably lead to the abnormal swimming behavior observed in the 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ treated zebrafish larvae.

MeHg exposure affects embryonic development

Previous studies have shown that MeHg exposure affects the developmental process of fathead minnow,²⁸ coho salmon,³¹ rainbow trout³² and carp embryos,³³ causing in all the cases a clear developmental delay as compared to control embryos. These data support our findings using zebrafish, where, as

commented before in the histological analysis, a remaining yolk was observed in larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg.

One of the proteins that appeared clearly up-regulated in larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg (3-fold compared to control larvae) is *he1b* which plays a crucial role in digesting the chorion during the hatching process of fish.³⁴ Previous studies have demonstrated that not only mercury³⁵ but also other heavy metals such as cadmium can affect negatively the hatching process in fish.³⁶ *Rbp4* appeared down-regulated in zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg. The inhibition of this protein has been associated with stage-specific malformations of the vitelline vessels, the cranial neural tube, and the eye. Reduced levels of *Rbp4* could be the cause for the morphological and histological alterations, e.g. malformation of the jaw and the notochord observed in our MeHg-exposed larvae.³⁷

Other proteins related to development and found de-regulated in our experiment were *zp2.4* and *si:dkeyp-50f7.2*. Both of them are associated with the zona pellucida or chorion and showed a significant up-regulation. Degradation of the chorion is a crucial step during development; thus, the presence of high amounts of these proteins in MeHg-exposed larvae as compared to controls, correlates well with the developmental delay observed as these proteins were expected to be down-regulated at this developmental stage.

Alteration of the protein synthesis mechanism due to MeHg exposure

Zebrafish larvae exposed to 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg showed a significant de-regulation of ribosomal proteins such as *rpl32a*, *rpl7a* (up-regulated) and *rpl10a* (down-regulated) involved in protein synthesis. It is known that *rpl7a* can induce apoptosis.³¹ Our data suggest that apoptosis associated with methylmercury toxicity might be mediated by *rpl7a*.^{32,33} The observed relationship between MeHg and the differential expression of ribosomal proteins in skeletal muscles of zebrafish³⁸ and hepatic cells³⁹ have also been previously pointed out. In addition, it has also been demonstrated that a reduced activity in ribosomal proteins may lead to deformation of the brain and body trunk,⁴⁰ which correlates well with our results in the histological analysis.

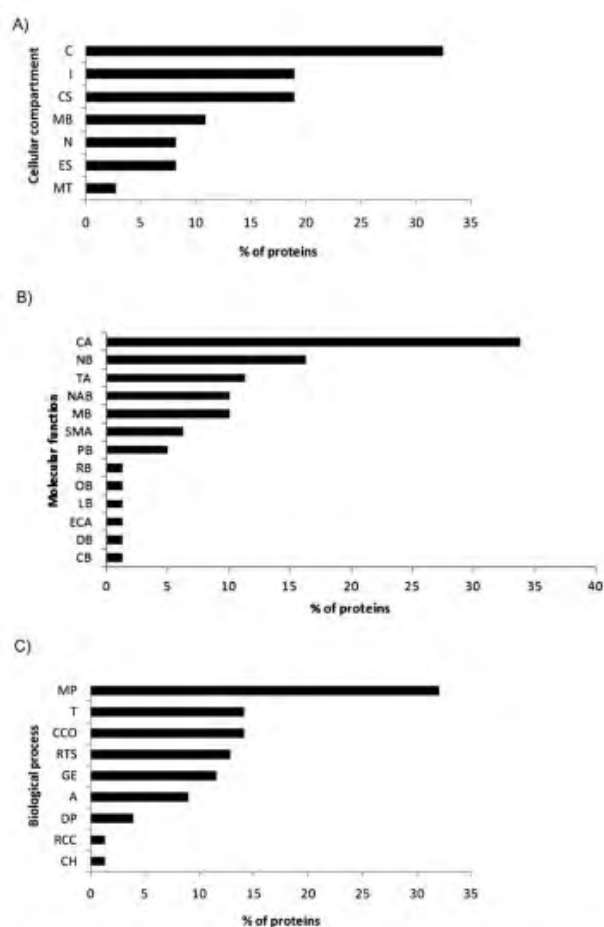


Fig. 3 Classification of the 76 de-regulated proteins according to: (A) cellular compartment. C, cytosol; I, intracellular; CS, cytoskeleton; MB, membrane; N, nucleus; ES, extracellular space; MT, mitochondria. (B) Molecular function. CA, catalytic activity; NB, nucleotide binding; TA, transporter activity; NAB, nucleic acid binding; MB, metal binding; SMA, structural molecule activity; PB, protein binding; RB, ribonucleoprotein binding; OB, oxygen binding; LB, lipid binding; ECA, electron carrier activity; DB, drug binding; CB, carbohydrate binding. (C) Biological process. MP, metabolic process; T, transport; CCO, cellular component organization; RTS, response to stimulus; GE, gene expression; A, apoptosis; DP, developmental process; RCC, regulation of cell cycle; CH, cellular homeostasis.

Other proteins associated with protein synthesis that have been found up-regulated in our study are *eif5a2*, *eef1a* and *hnnpab*. Recent studies³⁸ have indicated that *eif5a2* may be involved in apoptotic pathways; in fact, *eif5a2* may have pro-apoptotic functions. *Eef1a* has also been found up-regulated in zebrafish fed with a MeHg-contaminated diet.³⁸ It is an abundant and ubiquitous cellular protein responsible for the GTP-dependent recruitment of aminoacyl-tRNAs to the ribosome during the elongation cycle of protein translation and it has been implicated in facilitating the apoptosis, being essential for the protein synthesis needed to fuel the machinery required for apoptosis.³⁸ Our data show that due to MeHg treatment several molecules related to apoptosis are de-regulated suggesting increased cell death in the developing organism due to MeHg treatment.

Calcium homeostasis represents a key mechanism of MeHg-induced toxicity

Calreticulin is a highly conserved multifunctional Ca^{2+} buffering chaperone localized in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) where it binds to newly synthesized glycoproteins, thus preventing their aggregation and assisting in their correct protein folding.⁴¹ Increased expression of calreticulin results in elevated Ca^{2+} concentrations that cause the ER stress.⁴² In a previous study where Atlantic cod was exposed to Hg-enriched sediments, calreticulin was found significantly up-regulated in gills and liver, thus suggesting the potential of this protein as an ecotoxicity marker of exposure to Hg and possibly, to other heavy metals that may interfere with Ca^{2+} homeostasis.⁴³

Several parvalbumin proteins such as *pvalb2* and *pvalb9* were up-regulated at the two concentrations of MeHg tested, whereas *pvalb1* was down-regulated at the highest dose of MeHg. Parvalbumins are calcium-binding proteins that have been previously associated with several clinical disorders such as Alzheimer's disease, nervous system disorders, age-related cognitive defects and some forms of cancers,⁴⁴ with all of them also related to the toxic effects associated with MeHg exposure. In addition, also supporting this fact, a previous study has shown de-regulation of the genes encoding parvalbumins after exposing zebrafish to MeHg.³⁰

It is also important to mention the close relationship existing between the disturbances in calcium homeostasis with the generation of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria,⁴⁵ the latter being a well-established effect related to MeHg-induced cell death.⁴⁶ The oxidative stress conditions due to MeHg exposure may accelerate protein degradation by autophagy and by the ubiquitin-proteasome system. In fact, several proteins related to lysosomal and autophagic functions such as vitellogenins, V-ATPase, ER proteins and microtubule-associated proteins were found de-regulated in our experiment.

MeHg exposure affects the energy production machinery

Several proteins related to energy production such as *ckmb* and two ATPases (*atp6v1a*, *atp6v1ba*) were found de-regulated after MeHg exposure. The inactivation of ATPases has been related to pathological and physiological abnormalities, and with neurodegenerative diseases.⁴⁷ Mercurial compounds, especially MeHg, have been reported to specifically bind this type of enzyme, thus suppressing their activity and causing cellular and organic dysfunction.⁴⁸ In addition, the induction of oxidative stress, which is a phenomenon involved in MeHg-induced toxicity, has also been closely related to the inhibition of ATPase activities, supporting our findings.⁴⁹

Other processes affected by MeHg exposure

The results from our iTRAQ experiment, indicate that other proteins may play an important role in the developmental toxicity induced by MeHg and the biological processes implicated are as follows: *flnb*, which is an actin binding protein and have been previously shown to be altered by exposure to most heavy metals such as zinc, arsenic, mercury and cadmium, causing disruption of actin and microtubules in intact cells and thus, affecting the cellular organization.⁵⁰ The observed

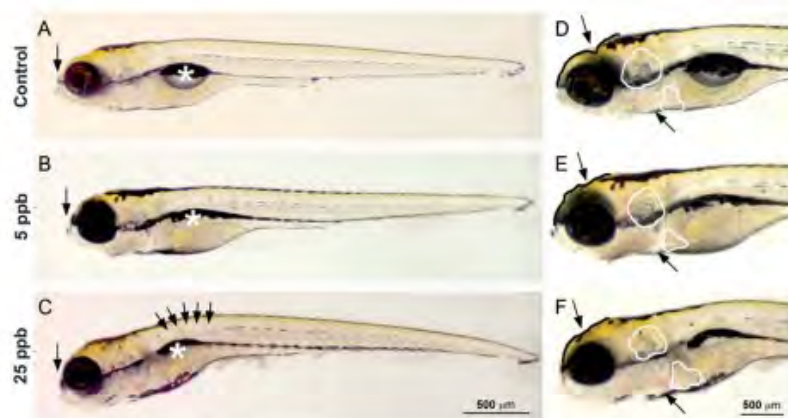


Fig. 4 Zebrafish larvae treated for 3 consecutive days with methylmercury ($5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $25 \mu\text{g L}^{-1}$) starting at 3 days postfertilization (dpf). (B and C) The swim bladder is indicated by an asterisk and the upper jaw by an arrow. (D–F) The shape of the brain is outlined by a black line and the fold between the telencephalon and the tectum is indicated by an arrow. The ear and the liver are outlined by white lines.

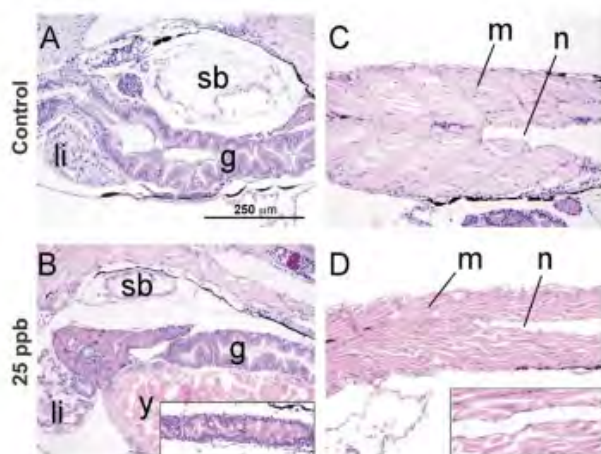


Fig. 5 Histological analysis of 6 dpf zebrafish larvae treated for 3 days with $25 \mu\text{g L}^{-1}$ methylmercury. (A) Longitudinal section of a 6 dpf zebrafish control larva showing the trunk region. (B) Longitudinal section of a 6 dpf zebrafish treated with $25 \mu\text{g L}^{-1}$ showing the trunk region. (C) Posterior trunk region of a control 6 dpf zebrafish larva showing the myotomes (m) and the notochord (n). (D) Posterior trunk region of a zebrafish larva treated with $25 \mu\text{g L}^{-1}$ of MeHg.

increased expression of *Gstp1*, *Prdx3* and *Pdia4* may be induced by the oxidative stress conditions. In the case of *Gstp1*, its up-regulation is consistent with our previous study carried out *in vitro* with HepG2 cells,⁷ in which an increased GST activity was observed after 2 h of MeHg exposure and continued increasing up to 24 h. This increased GST activity could be related to the cellular detoxification of MeHg⁴¹ since GST catalyses the reaction of endogenous GSH with xenobiotics to yield less toxic conjugates that are easily eliminated.⁵¹ *Prdx3* is a protein involved in the antioxidant defense system with an active dithiol site which is responsible for the reduction of SH groups in several proteins that have been oxidized under a situation of oxidative stress. In our experiment, *prdx3* appeared up-regulated, thus showing another potential defense mechanism against MeHg toxicity.⁵² Another protein found up-regulated in zebrafish larvae exposed to $25 \mu\text{g L}^{-1}$ MeHg was *mvp*, which is linked to

multidrug resistance; in fact, high levels of *mvp* have been found in tissues chronically exposed to xenobiotics. In addition, the expression of *mvp* is correlated with the degree of malignancy in certain types of cancer, suggesting a direct involvement in tumor development and/or progression.⁵³ *Chia* was one of the proteins found with a high iTRAQ ratio in larvae exposed to the highest concentrations of MeHg. This protein is involved in carbohydrate metabolism and so far has only been shown to be induced in plants exposed to mercury. Moreover, it is known that up-regulation of glutathione S-transferase (*gstp1*) may induce pathogenesis-related proteins such as chitinase,^{54,55} in agreement with our results where both glutathione S-transferase and chitinase (*chia*) have been found over-expressed. Fibronectin, found up-regulated at 25 ppb MeHg exposure, is a glycoprotein involved in cell adhesion and migration processes including embryogenesis, wound healing, blood coagulation and host defense. *In situ* hybridization studies show specific enrichment of this protein in epidermis (ESI, Table S3†).

Conclusion

We have applied a quantitative proteomic approach for the identification of novel protein targets and pathways associated with the developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. From the methodological point of view, iTRAQ has been combined with two different peptide separation techniques (SCX and IEF) showing a significant increase in the proteome coverage. Our experiments have identified a number of proteins whose expression is altered upon MeHg exposure, thus providing a set of targets closely related to MeHg induced toxicity. This has allowed us for the identification of crucial biological and molecular functions affected by MeHg such as embryonic development, calcium homeostasis, protein synthesis and energy production. Our findings have correlated well with previous studies and have also proposed novel targets for future studies, thus providing a deeper knowledge on the toxicity induced by MeHg in developing organisms. In addition, the morphological and histological analyses of zebrafish larvae have supported the results obtained by our proteomic approach.

Acknowledgements

J.L.L.-G. was financially supported by the "Ramón y Cajal" program from the Spanish Ministry of Science and Innovation. S.C. was supported by a FPU predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education. P.X.-E. was partially supported by the Spanish National Institute of Health (grant no. CA10/01231). We thank Eduardo Díaz from the Spanish National Cardiovascular Research Center (CNIC) for kindly providing the zebrafish larvae. This work was partially supported by grants CTQ2010-18644 and CTQ2011-28328C02-01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and a grant from the Comunidad de Madrid (Analisisc II).

References

- W. Baeyens, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 1992, **11**, 245–254.
- M. Leemackers, W. Baeyens, P. Quevauviller and M. Horvat, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 383–393.
- D. S. Forsyth, V. Casey, R. W. Dabeka and A. McKenzie, *Food Addit. Contam.*, 2005, **22**, 535–540.
- A. V. Weisbrod, L. P. Burkhard, J. Arnot, O. Mekeyan, P. H. Howard, C. Russom, R. Boethling, Y. Sakuratani, T. Traas, T. Bridges, C. Lutz, M. Bonnell, K. Woodburn and T. Pakerton, *Environ. Health Perspect.*, 2007, **115**, 255–261.
- K. Eto, *Toxicol. Pathol.*, 1997, **25**, 614–623.
- M. Aschner, T. Syversen, D. O. Souza, J. B. Rocha and M. Farina, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2007, **40**, 285–291.
- S. Cuello, L. Goya, Y. Madrid, S. Campuzano, M. Pedrero, L. Bravo, C. Camara and S. Ramos, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, **48**, 1405–1411.
- G. L. Engel, A. Delwig and M. D. Rand, *Toxicol. In Vitro*, 2012, **26**, 485–492.
- M. Fujimura and F. Usuki, *Toxicol. Sci.*, 2012, **126**, 506–514.
- K. M. Coombs, *Expert Rev. Proteomics*, 2011, **8**, 631–643.
- M. Wilm, *Proteomics*, 2009, **9**, 4590–4605.
- X. H. Li, C. Li and Z. Q. Xiao, *J. Proteomics*, 2011, **74**, 2642–2649.
- K. Berg, P. Puntervoli, S. Valdersnes and A. Goksoyr, *Aquat. Toxicol.*, 2010, **100**, 51–65.
- O. J. Nostbakken, S. A. Martin, P. Cash, B. E. Torstensen, H. Amlund and P. A. Olsvik, *Aquat. Toxicol.*, 2012, **108**, 70–77.
- P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattian, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson and D. J. Pappin, *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, **3**, 1154–1169.
- K. Ashman, M. I. Ruppen-Cañas, J. L. Luque-García and F. García-Martínez, Stable Isotopic Labeling for Proteomics, in *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*, ed. A. R. Ivanov and A. V. Lazarev, Springer Science + Business Media B.V., 2011, pp. 549–573.
- S. Cuello, J. Sanz-Landaluze, Y. Madrid, J. Guinea and C. Camara, *Talanta*, 2012, **80**, 160–177.
- I. Ruppen, L. Grau, E. Oreñes-Piñero, K. Ashman, M. Gil, F. Algaba, J. Bellmunt and M. Sanchez-Carbajo, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, **9**, 2276–2291.
- R. J. Slebos, J. W. Brock, N. F. Winters, S. R. Stuart, M. A. Martinez, M. Li, M. C. Chambers, L. J. Zimmerman, A. J. Ham, D. L. Tabb and D. C. Liebler, *J. Proteome Res.*, 2008, **7**, 5286–5294.
- S. Hussain, A. Atkinson, S. J. Thompson and A. T. Khan, *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 1999, **34**, 645–660.
- X. Ji, W. Wang, J. Cheng, T. Yuan, X. Zhao, H. Zhang and L. Qu, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, **22**, 309–314.
- H. Ashour, M. Abdel-Rahman and A. Khodair, *Toxicol. Lett.*, 1993, **69**, 87–96.
- N. Mori, A. Yasutake and K. Hirayama, *Arch. Toxicol.*, 2007, **81**, 769–776.
- Y. Bradford, T. Conlin, N. Dunn, D. Fashena, K. Frazer, D. G. Howe, J. Knight, P. Mani, R. Martin, S. A. Moxon, H. Paddock, C. Pich, S. Ramachandran, B. J. Ruef, L. Ruzicka, H. Bauer Schaper, K. Schaper, X. Shao, A. Singer, J. Sprague, B. Sprunger, C. Van Slyke and M. Westerfield, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**(suppl 1), D822–D829.
- E. W. Devlin, *Ecotoxicology*, 2006, **15**, 97–110.
- J. R. Sharp and J. M. Neff, *Mar. Environ. Res.*, 1980, **3**, 195–213.
- J. C. Samson and J. Shenker, *Aquat. Toxicol.*, 2000, **48**, 343–354.
- E. W. Devlin and N. K. Mottet, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, **49**, 449–454.
- E. W. Devlin and N. K. Mottet, *Environ. Sci.*, 1991, **1**, 35–46.
- K. J. Helmcke, T. Syversen, D. M. Miller 3rd and M. Aschner, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, **240**, 265–272.
- M. S. Lindström, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, **379**, 167–170.
- B. J. Shenker, L. Pankoski, A. Zekavat and I. M. Shapiro, *Antioxid. Redox Signaling*, 2002, **4**, 379–389.
- J. L. Franco, T. Posser, P. R. Dunkley, P. W. Dickson, J. J. Mattos, R. Martins, A. C. D. Bainy, M. R. Marques, A. L. Dafre and M. Farina, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, **47**, 449–457.
- A. Okada, K. Sano, K. Nagata, S. Yasumasu, J. Ohtsuka, A. Yamamura, K. Kubota, I. Iuchi and M. Tanokura, *J. Mol. Biol.*, 2010, **402**, 865–878.
- W. Huang, L. Cao, J. Liu, L. Lin and S. Dou, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2010, **73**, 1875–1883.
- P. Szczerbik, T. Mikolajczyk, M. Sokolowska-Mikolajczyk, M. Socha, J. Chyb and P. Epler, *Aquat. Toxicol.*, 2008, **53**, 36–44.
- C. Bavik, S. J. Ward and P. Chambon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 3110–3114.
- S. Cambier, P. Gonzalez, G. Durrieu, R. Maury-Brachet, A. Boudou and J. P. Bourdineaud, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 469–475.
- S. Cuello, S. Ramos, Y. Madrid, J. L. Luque-García and C. Camara, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 315–324.
- T. Uechi, Y. Nakajima, A. Nakao, H. Torihara, A. Chakraborty, K. Inoue and N. Kenmochi, *PLoS One*, 2006, **1**, e37.
- Y. Y. Qiu and M. Michalak, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009, **41**, 531–538.
- X. C. Zhang, E. Szabo, M. Michalak and M. Opas, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2007, **25**, 455–463.
- P. A. Olsvik, M. Brattas, K. K. Lie and A. Goksoyr, *Chemosphere*, 2011, **83**, 552–563.
- M. S. Cates, M. L. Teodoro and G. N. Phillips, *Biophys. J.*, 2002, **82**, 1133–1146.
- M. J. Hansson, R. Månsson, S. Morota, H. Uchino, T. Kallur, T. Sumi, N. Ishii, M. Shimazu, M. F. Keepe, A. Jegorov and E. Elmér, *Free Radical Biol. Med.*, 2008, **45**, 284–294.
- P. Kaur, M. Aschner and T. Syversen, *Toxicology*, 2007, **230**, 164–177.
- S. P. Yu, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 1601–1609.
- J. J. Chu, S. H. Liu and S. Y. Lin-Shiau, *Toxicol. Lett.*, 2007, **169**, 109–120.
- R. Rodrigo, J. P. Bachler, J. Araya, H. Prat and W. Passalacqua, *Mol. Cell. Biochem.*, 2007, **303**, 73–81.
- B. Stamova, P. G. Green, Y. Tian, I. Hertz-Picciotto, I. N. Pessah, R. Hansen, X. Yang, J. Teng, J. P. Gregg, P. Ashwood, J. Van de Water and F. R. Sharp, *Neurotoxic. Res.*, 2011, **19**, 31–48.
- R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi and C. Giovannini, *J. Nutr. Biochem.*, 2005, **16**, 577–586.
- J. Gao, Z. R. Zhu, H. Q. Ding, Z. Qian, L. Zhu and Y. Ke, *Neurochem. Int.*, 2007, **50**, 379–385.
- E. Steiner, K. Holzmann, L. Elbling, M. Micksche and W. Berger, *Curr. Drug Targets*, 2006, **7**, 923–934.
- W. Maksymiec, *Acta Physiol. Plant.*, 2007, **29**, 177–187.
- S. Sarowar, Y. J. Kim, E. N. Kim, K. D. Kim, B. K. Hwang, R. Islam and J. S. Shin, *Plant Cell Rep.*, 2005, **24**, 216–224.

Supplementary Information

- **Protein ID/QT Methods**
- **Table S1.** Proteins found de-regulated in 6 dpf zebrafish larvae exposed to 5 µg/L of MeHg.
- **Table S2.** Proteins found de-regulated in 6dpf zebrafish larvae exposed to 25 µg/L of MeHg.
- **Table S3.** References supporting the organ-specific location of proteins found deregulated upon 25 µg/L MeHg exposure based on in-situ hybridization studies.
- **Figure S1.** Number of identified proteins in the different SCX and IEF fractions in both biological replicates (ZFA and ZFB).
- **Figure S2.** Top network generated by IPA. The associated network functions include cellular assembly and organization; cellular function and maintenance; and cellular movement.
- **Figure S3.** Differences in the size of the swim bladder of control (A) and ZF exposed to 5 (B) and 25 µg/L (C) of MeHg.
- **Figure S4.** Morphological and histological analyses of the eye of control (A, D) and ZF exposed to 5 (B, E) and 25 µg/L (C, F) of MeHg .

Protein ID/QT Methods

Protein identification and relative quantification were performed with the ProteinPilot™ software (version 3.0; ABSCIEX) using the Paragon™ algorithm as the search engine. Each MS/MS spectrum was searched against the NCBI *Danio rerio* database (released on 08/31/2010) containing 27587 entries, downloaded from ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/D_rerio/protein/. The target plus reversed protein database contained 55174 proteins. The search parameters allowed for cysteine modification by methyl methane-thiosulfonate and the 220 biological modifications programmed in the algorithm (i.e., phosphorylations, amidations, semitryptic fragments, etc.). The detected protein threshold (Unused ProtScore (conf)) in the software was set to 1.3 to achieve 95% confidence and identified proteins were grouped by the ProGroup algorithm (Applied Biosystems) to minimize redundancy. The bias correction option was executed so the ratios of each analysis were automatically normalized.

To compare the performance of each separation technique at the protein identification level, the complete set of raw data files of each approach was analysed independently using ProteinPilot, which includes Paragon and ProGroup algorithms). A comparison between the gi Accession numbers of identified proteins from SCX and IEF approaches was carried out using Venn diagrams (Oliveros, J.C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfoqg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

The peptide and protein selection criteria for relative quantitation were performed as follows. Proteins were identified on the basis of having at least two peptides with an ion score above 95% confidence. Only peptides unique for a given protein were considered for relative quantitation, excluding those

common to other isoforms or proteins of the same family. Among the identified peptides, some of them were excluded from the quantitative analysis for one of the following reasons: i) the peaks corresponding to the iTRAQ labels were not detected, ii) they were identified with low ID confidence ($< 1.0\%$), iii) because of shared MS/MS spectra, when either the same peptide sequence is claimed by more than one protein or when more than one peptide is fragmented at the same time, iv) the peptide ratios where the sum of the signal-to-noise ratio for all of the peak pairs was < 9 , v) peptides with a combined feature probability less than 30%, including semi-tryptic peptides, peptides missing an iTRAQ reagent label, peptides with low probability modifications and peptides with large delta masses. The protein sequence coverage (95%) was estimated for specific proteins by the percentage of matching amino acids from the identified peptides having confidence greater than or equal to 95% divided by the total number of amino acids in the sequence.

Two quantitative estimates provided for each protein by the ProteinPilot™ were utilized: the fold change ratios of differential expression between labelled protein extracts and the P value, representing the probability that the observed ratio is different to 1 by chance. To estimate and minimize the false discovery rate (FDR), defined as the percentage of decoy proteins identified against the total protein identification, a target-decoy search strategy was followed using a protein sequence database that combines forward and reverse amino acid orientation of every NCBI zebrafish protein sequence. The estimated FDR was less than 0.3% in both biological replicates, indicating high reliability in the proteins identified.

The results were then exported into Excel for manual data interpretation. Although relative quantification and statistical analysis were provided by the ProteinPilot 3.0 software, an additional 1.5-fold change cutoff for all iTRAQ ratios (ratio <0.67 or >1.5) was selected to classify proteins as up- or down-regulated. Proteins with iTRAQ ratios below the low range (0.67) were considered to be under-expressed, while those above the high range (1.5) were considered overexpressed. The average ratio provided by ProteinPilot includes correction from experimental bias and is inversely weighted by the % Error on each distinct peptide. For further information about how the average ratio is calculated, please refer to the manual.

Table S1. Proteins found de-regulated in 6 dpf zebrafish larvae exposed to 5 µg/L of MeHg.

Accession number (gil)	Protein name	Common name	Peptides (95%)	iTRAQ ratio 5:Contr	PVMeHg 5:Contr
47550733	SERPINE1 mRNA binding protein 1	serbp1	6	2.905	0.008
18858587	elongation factor 1-alpha	eef1a	25	1.764	0.011
18858197	glutathione S-transferase pi	gstp1	11	2.129	0.0001
18859297	parvalbumin-2	pvalb2	18	1.677	0.0003
157787181	muscle creatine kinase b	ckmb	42	1.659	0.0053
33636707	parvalbumin 9	pvalb9	5	1.623	0.0062
55742597	eukaryotic translation initiation factor 5A-2	eif5a2	3	1.589	0.0355
31795559	troponin T3b, skeletal, fast isoform 2	tnnt3b	13	1.538	0.0102
18858947	keratin 4	krt4	58	1.537	0.0010
113678458	vitellogenin 2 isoform 1	vtg2	650	0.647	0.000
156713467	vitellogenin 7	vtg7	795	0.641	0.001
68448530	vitellogenin 5	vtg5	878	0.639	0.000
189523697	PREDICTED: titin b	ttnb	18	0.636	0.017
303227889	vitellogenin 6	vtg6	957	0.633	0.004
68444085	PREDICTED: microfibrillar-associated protein 4-like	mfap4	2	0.557	0.027
66472252	slow myosin heavy chain 1	smyhc1	21	0.539	0.005
189523699	PREDICTED: titin a	ttna	10	0.415	0.001
238776848	myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle	myhz1.2	69	0.261	0.000

Table S2. Proteins found de-regulated in 6dpf zebrafish larvae exposed to 25 µg/L of MeHg.

Accession number (gil)	Protein name	Common name	Peptides (95%)	iTRAQ ratio 25:Contr	PVMeHg 25:Contr
189521249	PREDICTED: hypothetical protein		7	15.100	0.038
24308537	zona pellucida glycoprotein 2.4	zp2.4	20	7.442	0.000
47086603	ZPA domain containing protein isoform 2	si:dkeyp-50f7.2	9	7.234	0.002
41055329	acidic chitinase	chia	5	6.041	0.006
94536701	ZPA domain containing protein isoform 1	si:dkeyp-50f7.2	9	6.038	0.003
156739289	hypothetical protein LOC569326	im:6910535	4	5.993	0.001
125816799	PREDICTED: si:dkey-46g23.2	si:dkey-46g23.2	26	5.828	0.001
61651682	fibronectin 1b	fn1b	6	3.654	0.006
226442998	hatching enzyme 1b	he1b	8	3.115	0.002
288856329	myosin, heavy polypeptide 1.1, skeletal muscle	myhz1.1	47	3.049	0.000
238776848	myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle	myhz1.2	69	2.304	0.000
50355968	calreticulin like	calrl	10	2.154	0.047
41054259	protein disulfide-isomerase A4	pdia4	12	2.136	0.017
82658290	high-mobility group box 2	hmgb2	10	2.105	0.017
292610077	PREDICTED: complement component 3	c3	5	2.082	0.027
53749651	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	ppib	12	2.061	0.016
18858197	glutathione S-transferase pi	gstp1	11	2.046	0.001
18859107	nucleoside diphosphate kinase A	nme2b.1	8	2.007	0.003
125827065	PREDICTED: si:dkey-88l16.3	si:dkey-88l16.3	2	1.982	0.036
33636707	parvalbumin 9	pvalb9	5	1.948	0.041
292618718	PREDICTED: vitellogenin 3, phosvitinless	vtg3	61	1.862	0.000
41152406	FK506 binding protein 1A, 12kDa	fkbp1aa	4	1.861	0.029

71143098	tenascin C	tnc	3	1.845	0.036
40254675	lamin-B1	lmnb1	6	1.844	0.006
189523699	PREDICTED: titin a	ttna	10	1.832	0.007
82524272	complement component c3b	c3b	4	1.805	0.018
189535920	PREDICTED: filamin A, alpha	flna	30	1.802	0.000
41393111	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	uchl1	12	1.793	0.016
292619135	PREDICTED: filamin B, like, partial	flnb	5	1.776	0.007
30410758	keratin, type I cytoskeletal 18	krt18	6	1.726	0.004
67972636	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	hnmpab	8	1.713	0.049
18859297	parvalbumin-2	pvalb2	18	1.619	0.006
56118638	profilin-2	pfn2l	4	1.618	0.004
41151982	major vault protein	mvp	8	1.595	0.017
55925229	ribose-5-phosphate isomerase	rpia	5	1.575	0.010
65301457	thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	prdx3	3	1.569	0.034
48597012	60S ribosomal protein L23a	rpl23a	4	1.566	0.004
41152461	60S ribosomal protein L7a	rpl7a	2	1.560	0.008
41386743	eukaryotic translation elongation factor 2b	eef2b	33	1.558	0.038
292611632	PREDICTED: hypothetical protein LOC325896	BX901973. 4	5	1.557	0.045
68442739	PREDICTED: histone H4 replacement-like	his4r	13	1.549	0.024
41053774	endoplasmic reticulum resident protein 44	erp44	3	1.542	0.043
41152439	60S ribosomal protein L10a	rpl10a	5	0.666	0.006
71834286	apolipoprotein B, like	apobl	67	0.653	0.000
292619319	PREDICTED: retinol-binding protein 4, plasma-like	rbp4	2	0.653	0.015
45387573	parvalbumin isoform 1d	pvalb1	10	0.649	0.007
51571925	adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	5	0.639	0.048
292627608	PREDICTED: ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit A	atp6v1a	2	0.639	0.008
41054770	WD repeat-containing protein 1	wdr1	2	0.634	0.007
48762657	alpha-enolase	eno1	9	0.625	0.020
54261787	interleukin enhancer-binding factor	ilf2	5	0.621	0.043

	2 homolog				
292617604	PREDICTED: crystallin, gamma C-like	crygc	7	0.609	0.018
18858425	keratin 5	krt5	16	0.595	0.008
41054746	glycine amidinotransferase, mitochondrial	gatm	2	0.590	0.043
47550793	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	nnt	4	0.476	0.046
33504543	V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	atp6v1ba	3	0.467	0.022
62632719	hemoglobin beta embryonic-3	hbbe3	5	0.451	0.042
27545277	elongation factor 1-gamma	eef1g	8	0.407	0.035

Table S3. References supporting organ-specific localization of proteins found de-regulated upon MeHg exposure based on in-situ hybridization studies.

Accession Number (gi)	Gene name	Protein Name	iTRAQ ratio	Location	Reference
189521249		hypothetical protein	15.10		
24308537	zp2.4	zona pellucida glycoprotein 2.4	7.44		
47086603	si:dkeyp-50f7.2	ZPA domain containing protein isoform 2	7.23		
41055329	chia	acidic chitinase	6.04	gut	Rauch, G.J., Lyons, D.A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T., and Talbot, W.S. (2003) Submission and Curation of Gene Expression Data. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).
94536701	si:dkeyp-50f7.2	ZPA domain containing protein isoform 1	6.04		
156739289	im:6910535	hypothetical protein LOC569326	5.99		
125816799	si:dkey-46g23.2	si:dkey-46g23.2	5.83		
61651682	fn1b	fibronectin 1b	3.65	notocord, liver, epidermis	Thisse, B, Pfumio, S., Fürthauer, M., Loppin B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C. Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. ZFIN on-line publication, 2001
226442998	he1b	hatching enzyme 1b	3.12		
288856329	myhz1.1	myosin, heavy polypeptide 1.1, skeletal muscle	3.05	fast muscle	Rauch, G.J., Lyons, D.A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T., and Talbot, W.S. (2003) Submission and Curation of Gene Expression Data. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).

238776848	myhz1.2	myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle	2.30	fast muscle	Kotani, T., and Kawakami, K. (2008) misty somites, a maternal effect gene identified by transposon-mediated insertional mutagenesis in zebrafish that is essential for the somite boundary maintenance. Dev. Biol. 316(2): 383-396.
50355968	calrl	calreticulin like	2.15		
41054259	pdia4	protein disulfide-isomerase A4	2.14		
82658290	hmgb2	high-mobility group box 2	2.11	expressed ubiquitously	Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org)
292610077	c3	complement component 3	2.08	liver	Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).
53749651	ppib	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2.06		
18858197	gstp1	glutathione S-transferase pi	2.05	liver	Cheng, W., Guo, L., Zhang, Z., Soo, H.M., Wen, C., Wu, W., and Peng, J. (2006) HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish. Dev. Biol. 294(2): 482-496.
18859107	nme2b.1	nucleoside diphosphate kinase A	2.01	whole body, heart	Hippe, H.J., Wolf, N.M., Abu-Taha, I., Mehringer, R., Just, S., Lutz, S., Niroomand, F., Postel, E.H., Katus, H.A., Rottbauer, W., and Wieland, T. (2009) The interaction of nucleoside diphosphate kinase B with Gbetagamma dimers controls heterotrimeric G protein function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(38): 16269-16274.
125827065	si:dkey-88116.3	si:dkey-88116.3	1.98		
33636707	pvalb9	parvalbumin 9	1.95		

292618718	vtg3	vitellogenin 3, phosvitinless	1.86		
41152406	fkbp1aa	FK506 binding protein 1A, 12kDa	1.86		
71143098	tnc	tenascin C	1.85		
40254675	lmnb1	lamin-B1	1.84		
189523699	ttna	titin a	1.83	musculature system, myotome, pectoral fin musculature	Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org)
82524272	c3b	complement component c3b	1.81	liver	Wang, Z., Zhang, S., and Wang, G. (2008) Response of complement expression to challenge with lipopolysaccharide in embryos/larvae of zebrafish <i>Danio rerio</i> : Acquisition of immunocompetent complement. <i>Fish Shellfish Immunol.</i> 25(3): 264-270
189535920	flna	filamin A, alpha	1.80		
41393111	uchl1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1.79		
292619135	flnb	filamin B, like, partial	1.78		
30410758	krt18	keratin, type I cytoskeletal 18	1.73		
67972636	hnnpab	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	1.71	brain, lateral line system	Rauch, G.J., Lyons, D.A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T., and Talbot, W.S. (2003) Submission and Curation of Gene Expression Data. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org)
18859297	pvalb2	parvalbumin-2	1.62		
56118638	pfn2l	profilin-2	1.62		

41151982	mvp	major vault protein	1.60	blastema m enchymal cell	Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2009) Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. <i>Dev. Biol.</i> 325(1): 71-81
55925229	rpia	ribose-5-phosphate isomerase	1.58		
65301457	prdx3	thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1.57		
48597012	rpl23a	60S ribosomal protein L23a	1.57		
41152461	rpl7a	60S ribosomal protein L7a	1.56		
41386743	eef2b	eukaryotic translation elongation factor 2b	1.56	epidermis	Rauch, G.J., Lyons, D.A., Middendorf, I., Friedlander, B., Arana, N., Reyes, T., and Talbot, W.S. (2003) Submission and Curation of Gene Expression Data. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).
292611632	BX901973.4	hypothetical protein LOC325896	1.56		
68442739	his4r	histone H4 replacement-like	1.55		
41053774	erp44	endoplasmic reticulum resident protein 44	1.54		
41152439	rpl10a	60S ribosomal protein L10a	-1.49		
71834286	apobl	apolipoprotein B, like	-1.54		
292619319	rbp4	retinol-binding protein 4, plasma-like	-1.54	liver	Cheng, W., Guo, L., Zhang, Z., Soo, H.M., Wen, C., Wu, W., and Peng, J. (2006) HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish. <i>Dev. Biol.</i> 294(2): 482-496
45387573	pvalb1	parvalbumin isoform 1d	-1.54	musculature system, myotome	Thisse, C., and Thisse, B. (2005) High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).
51571925	AK1	adenylate kinase isoenzyme 1	-1.56		

292627608	atp6v1a	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1	-1.56	central nervous system	Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).
41054770	wdr1	WD repeat-containing protein 1	-1.59		
48762657	eno1	alpha-enolase	-1.59		
54261787	ilf2	interleukin enhancer-binding factor 2	-1.61	blastema mesenchymal cell	Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2009) Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. Dev. Biol. 325(1): 71-81.
292617604	crygc	crystallin, gamma C-like	-1.64		
18858425	krt5	keratin 5	-1.67	epidermal cell	Reischauer, S., Levesque, M.P., Nüsslein-Volhard, C., and Sonawane, M. (2009) Lgl2 executes its function as a tumor suppressor by regulating ErbB signaling in the zebrafish epidermis. PLoS Genet. 5(11): e1000720
41054746	gatm	glycine amidinotransferase, mitochondrial	-1.69	Intestine, liver, pancreas	Cheng, W., Guo, L., Zhang, Z., Soo, H.M., Wen, C., Wu, W., and Peng, J. (2006) HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish. Dev. Biol. 294(2): 482-496.
47550793	nnt	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	-2.08		
33504543	atp6v1ba	V-type proton ATPase subunit B	-2.13		
62632719	hbbe3	hemoglobin beta embryonic-3	-2.22		
27545277	eef1g	elongation factor 1-gamma	-2.44	whole organism	Thisse, B., Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission (http://zfin.org).

Fig. S1

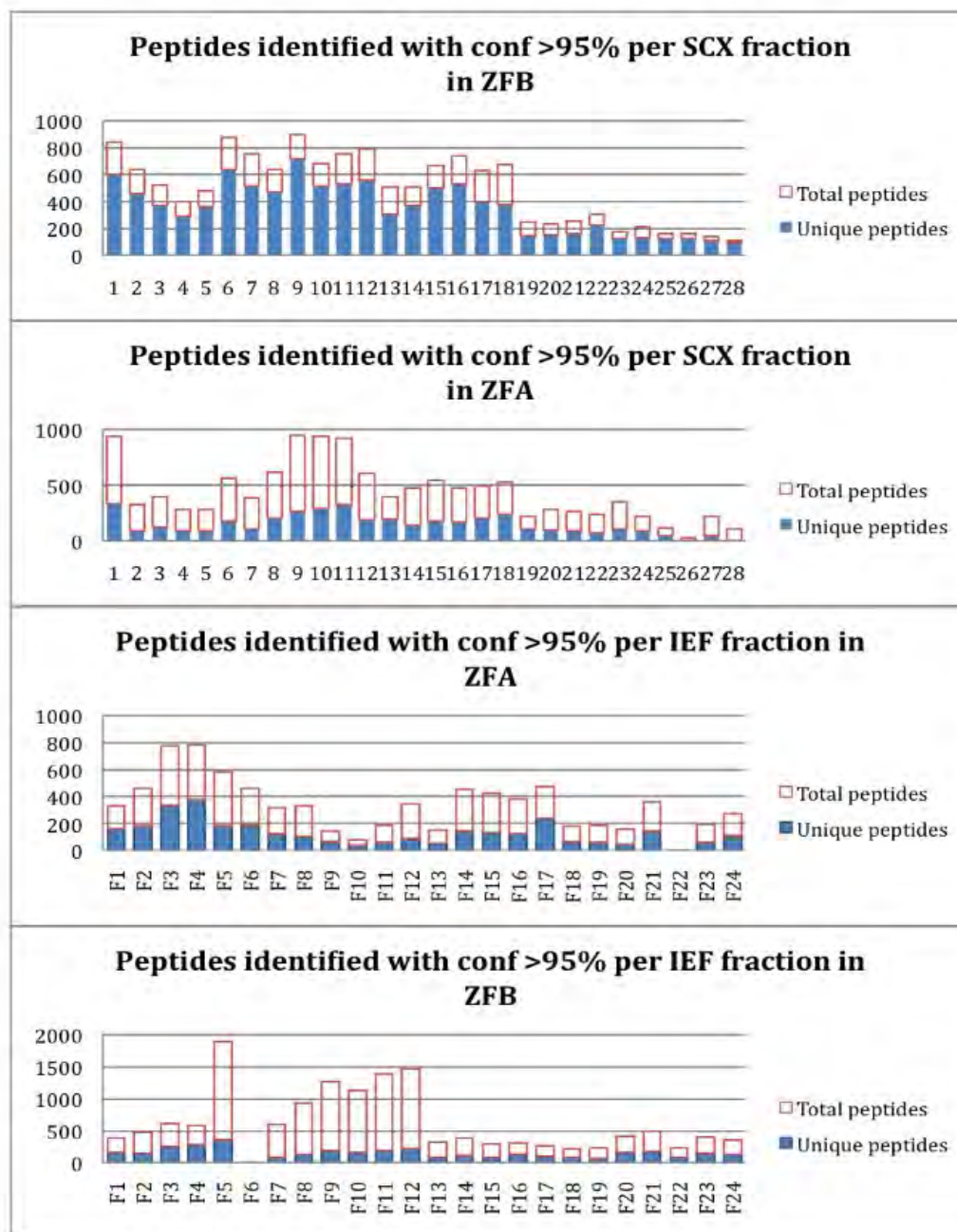


Fig. S2

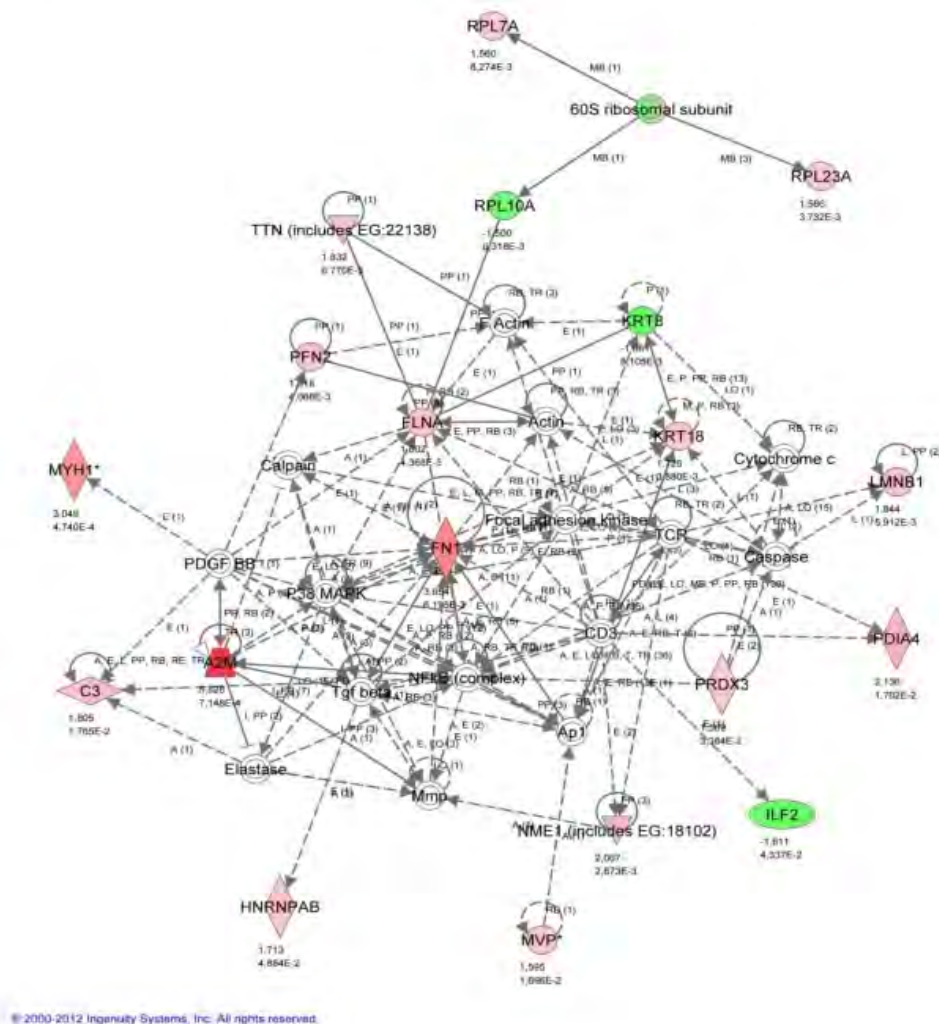


Fig. S3

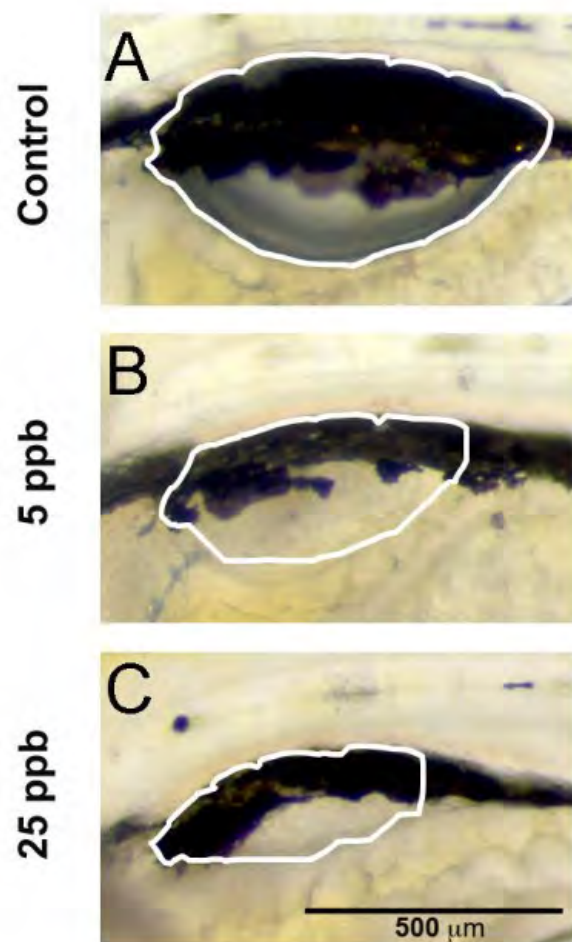
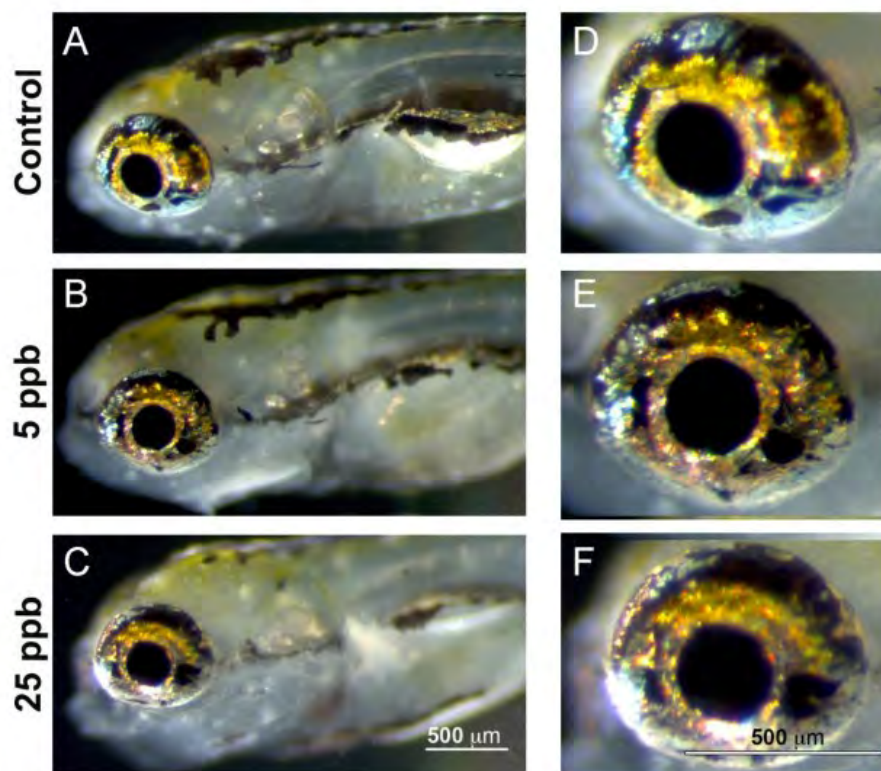


Fig. S4



5 .INTERACCIÓN SELENIO-MERCURIO

El estudio que se presenta a continuación está relacionado con el mecanismo protector del selenio frente a la toxicidad inducida por metilmercurio, ya que hay estudios que revelan que el selenio es capaz de interaccionar con metales tóxicos (Arsénico, Mercurio, Cadmio y Plata) reduciendo su toxicidad, aunque el mecanismo de dichas interacciones, a día de hoy, sigue sin esclarecerse del todo.

Para estudiar la interacción selenio-mercurio las células de hepatoma humano Hep G2 fueron co-tratadas con 8 μ M MeHg y distintas especies de selenio (SeMet, SeCys y SeMeSeCys) en concentraciones dentro del intervalo 1-25 μ M durante 24 horas donde se evaluaron parámetros relacionados con el estrés oxidativo (ROS) y mecanismos de defensa antioxidantes (como por ejemplos los niveles de GSH) ya que uno de los mecanismos de protección del selenio que se postulan es la prevención del daño oxidativo producido por el mercurio.

Debido a que en los distintos artículos publicados durante el transcurso de esta Tesis: **"Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411"**, **"Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity. Anal. Bional. Chem. 404 (2012) 315-324"** y **"Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. Analyst 137 (2012) 5302-5311"** se pone de manifiesto que la toxicidad del mercurio está relacionada con el fenómeno de apoptosis se midió la actividad de la caspasa-3 y se hicieron análisis por Western blot de los niveles de proteínas de la familia Bcl-2, todas ellas relacionadas con la muerte celular por apoptosis.

Dentro de este estudio se analizaron también proteínas relacionadas con las rutas de proliferación y supervivencia como son las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL EFECTO PROTECTOR DE LA
SELENOCYSTINA CONTRA LA MUERTE INDUCIDA POR METILMERCURIO EN CÉLULAS
DE HEPATOMA HUMANO HEP G2**

Isabel Cordero-Herrera, Susana Cuello, Luis Goya, Yolanda Madrid, Laura Bravo,
Carmen Cámara, Sonia Ramos

“Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against
methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells”

Food Chem. Toxicol., 2013, 59, 554-563



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells



Isabel Cordero-Herrera^a, Susana Cuello^b, Luis Goya^a, Yolanda Madrid^b, Laura Bravo^a, Carmen Cámara^b, Sonia Ramos^{a,*}

^aDepartamento de Metabolismo y Nutrición, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

^bDepartamento de Química Analítica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2013

Accepted 28 June 2013

Available online 6 July 2013

Keywords:

Methylmercury

Selenocystine

HepG2 cells

Antioxidant and detoxificant defences

Cell death

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) has been recognized as a very toxic contaminant present in certain foodstuffs that adversely affects health and impairs the normal function of different organs. Experimental studies have shown that selenocompounds play an important role as cellular detoxificant and protective agents against the harmful effects of mercury. The present study examined the potential preventive activities of organic selenocompounds, focused on selenocystine (SeCys), against MeHg-induced toxicity in human HepG2 cells.

Combined treatment of SeCys and MeHg protected HepG2 cells against MeHg-induced cell damage, showing this selenocompound a more relevant effect than those of selenium methylselenocysteine and selenium methionine. Co-treatment with SeCys exerted a protective effect against MeHg by restraining ROS generation and glutathione decrease, and through the modulation of antioxidant enzymes activities. In addition, SeCys delayed MeHg-induced apoptosis and prevented extracellular regulated kinases (ERKs) deactivation, as well as p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) stimulations in comparison to MeHg-treated cells. ERK, JNK and p38 involvement on the protective effect of SeCys against MeHg-induced cell damage was confirmed by using selective inhibitors. All these results indicate that SeCys protects against MeHg-induced cell damage by modulating the redox status and key proteins related to cell stress and survival/proliferation pathways.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Methylmercury (MeHg) is a well-known environmental toxic that may cause accidental and occupational exposures and lead to serious damage in various organs in human and experimental animals (Cuello et al., 2012; Honda et al., 2006). MeHg is one of the most toxic forms of mercury that is absorbed by the gastrointestinal tract, being brain, liver and kidney important target-organs for its toxicity (Honda et al., 2006; Ji et al., 2005; Mori et al., 2007). Fish consumption represents the main source of MeHg for humans, and a direct correlation between body burden of MeHg and fish consumption has been suggested (Honda et al., 2006).

Abbreviations: BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CAT, catalase; DTT, dithiotreitol; ERK, extracellular regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LDH, lactate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MeHg, methylmercury; ROS, reactive oxygen species; SeCys, selenocystine; SeMet, selenomethionine; SeMeSeCys, selenium methylselenocysteine.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 544 56 07; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: s.ramos@ictan.csic.es (S. Ramos).

MeHg has been reported to induce changes in mitochondria dyshomeostasis, over-production of reactive oxygen species (ROS) and impairment of important cellular antioxidant systems in different experimental models (Cuello et al., 2010; de Melo Reis et al., 2007; Farina et al., 2011; Ji et al., 2005; Kaur et al., 2007; Mori et al., 2007; Stacchiotti et al., 2009; Watanabe et al., 2009). In this regard, MeHg is able to interact with cellular low molecular weight thiol-containing compounds such as reduced glutathione (GSH), exposing cells to a highly pro-oxidative milieu (Cuello et al., 2010; de Melo Reis et al., 2007; Farina et al., 2011; Kaur et al., 2007; Watanabe et al., 2009). In addition, MeHg can activate signalling cascades involved in apoptosis and cellular responses to environmental stress (Cuello et al., 2010; Posser et al., 2010), such as members of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family, i.e. extracellular regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38.

Dietary antioxidants, which have a protective role against oxidative stress, have been proposed as protective or therapeutic agents to counteract liver damage (Cuello et al., 2007; Tapiero et al., 2003; Valdiglesias et al., 2010). Among dietary compounds considered for chemopreventive activity, organoselenium

compounds have been found to be less toxic than inorganic compounds (Block et al., 2001). Diet is the most important source of selenium compounds and could be found in fish, meat, grains and plants such as garlic, broccoli and onion (Block et al., 2001; Tapiero et al., 2003; Valdiglesias et al., 2010). The intake of this essential element is mainly as organic compounds, being the major chemical forms selenium methionine (SeMet), selenocystine (SeCys) and methylselenocysteine (Valdiglesias et al., 2010).

During the last decades there has been a growing interest in the use of organoselenium compounds in prevention and therapeutics because they can ameliorate the oxidative damage (Cuello et al., 2007; Farina et al., 2011; Joshi et al., 2011; Kalender et al., 2013; Kunwar et al., 2011; Li et al., 2012; Nogueira and Rocha, 2011; Nwokocha et al., 2012; Tapiero et al., 2003; Uzma et al., 2011), and seem to prevent different types of cancer (Block et al., 2001; Nogueira and Rocha, 2011; Tapiero et al., 2003; Valdiglesias et al., 2010). These protective effects of selenium have been associated with its presence as a cofactor in the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase, which are known to protect cellular components from oxidative damage (Kunwar et al., 2011; Tapiero et al., 2003; Uzma et al., 2011; Valdiglesias et al., 2010). In this line, it has been reported that selenocompounds might counteract or minimize Hg toxicity by favourably affecting the antioxidant defence system (de Freitas et al., 2009; Farina et al., 2011; Kalender et al., 2013; Kunwar et al., 2011; Uzma et al., 2011) and/or by inducing changes in the distribution, deposition and excretion of Hg (de Freitas et al., 2009; Farina et al., 2011; Korbas et al., 2010; Li et al., 2012). However, it should be highlighted that epidemiological evidence point out that overexposure to selenium can increase the risk of some chronic degenerative diseases such as cancer and diabetes (Nogueira and Rocha, 2011). In addition, despite that Hg and Se interactions are usually antagonistic, additive and synergistic toxic effects have also been reported (Farina et al., 2011; Orct et al., 2009). All these observations have contributed to drive the attention to the study of the largely unknown molecular mechanisms for the potentially beneficial role of the selenocompounds against MeHg-induced damage *in vivo*.

We have previously reported that treatment of human liver HepG2 cells with selenium methylselenocysteine (SeMeSeCys) conferred a significant protection against an oxidative insult induced by the pro-oxidant *tert*-butylhydroperoxide (Cuello et al., 2007). Additionally, in the same cell line, MeHg induced an oxidative stress responsible for apoptosis induction through caspase activation and alteration of the cellular antioxidant and detoxificant enzymatic system to later provoke cell death (Cuello et al., 2010). Thus, the present study was aimed to provide further insights on the molecular mechanism of action of organoselenium compounds, particularly SeCys, against MeHg-induced toxicity in HepG2 cells by evaluating parameters related to the cell death through the measurement of cell viability (crystal violet), lactate dehydrogenase (LDH), caspase-3 activity, and levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family members, as well as the modulation of proteins related to the cellular stress and survival/proliferation response, such as MAPKs. In addition, the potential counteraction induced by co-treatment with SeCys against the adverse effects of MeHg on the redox status, namely GSH levels, activities of enzymes related to GSH [GPx and glutathione reductase (GR)], and ROS has been studied.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Methylmercury was from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Crystal violet, pyruvate, NADH, NADPH, glutathione (GSH, reduced form), oxidized glutathione, SeMet, SeCys, SeMeSeCys, *o*-phthalaldehyde (OPT), dichlorofluorescein (DCFH), PD98059, SB203580, SP600125, gentamicin, penicillin G, and streptomycin were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Anti-ERK1/2 and anti-phospho-ERK1/2 recognizing phosphorylated Thr202/Thr204 of ERK1/2, anti-JNK1/2 and anti-phospho-

JNK1/2 recognizing phosphorylated Thr183/Tyr185 of JNK1/2, as well as anti-phospho-p38 recognizing phosphorylated Thr180/Tyr182 and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (9101, 9102, 9251, 9252, 9216 and 4697, respectively Izaia, Madrid, Spain). Anti-Bcl-x, anti-Bax, anti-Bad and anti-p38 α were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-634, sc-526, sc-943, and sc-535, respectively). Caspase-3 substrate (Ac-DEVD-AMC) was purchased from Pharmingen (BD Biosciences, Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad (Madrid, Spain). Cell culture dishes and cell culture medium were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and Lonza (Madrid, Spain), respectively.

2.2. Cell culture and methylmercury treatment

Human hepatoma HepG2 cells were maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. They were grown in plates with DMEM-F12 medium, supplemented with 2.5% fetal bovine serum (FBS) and 50 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. The culture medium was changed every other day and the cells were usually split 1:3 when they reached confluence. Plates were changed to FBS-free medium 24 h before the assay.

For SeCys, SeMet and SeMeSeCys treatment, different concentrations (1, 5, 10, 25 and 50 μ M) from a stock solution (1 mM) were diluted in serum-free culture medium and added to the cell plates for 24 h. The former doses were selected based on previous information (Cuello et al., 2007; Hoefig et al., 2011; Kumar et al., 2011). To evaluate the protective effect of the three selenium compounds against an oxidative insult, cells were co-incubated with different concentrations of the selenocompounds and 8 μ M MeHg for 24 h.

To study the time-course effects of SeCys and MeHg, cells were co-incubated with 10 μ M SeCys and 8 μ M MeHg, and then harvested at different exposure times (0, 2, 4, 6, 8, 16 and 24 h). The incubation periods were selected based on the time-course variations induced by MeHg on different parameters related to cellular redox status, apoptosis and cell death in HepG2 cells (Cuello et al., 2010).

In the experiments with the pharmacological inhibitors, cells were preincubated with 50 μ M PD98059 (specific inhibitor of ERK) 10 μ M SB203580 (specific inhibitor of p38) or with 40 μ M SP600125 (specific inhibitor of JNK) for 2 h prior to 24 h of SeCys + MeHg treatment.

2.3. Cell viability assay

Cell viability was determined by using the crystal violet assay (Granado-Serrano et al., 2007). In brief, HepG2 cells were seeded at low density (10⁴ cells per well) in 96-well plates, grown for 24 h and incubated with crystal violet (0.2% in ethanol) for 20 min. Plates were rinsed with water, allowed to dry, and 1% sodium dodecyl-sulfate was added. The absorbance corresponding to viable adherent cells was measured using a microplate reader at 560 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2.4. Cell proliferation assay (5-bromo-2'-deoxyuridine assay, BrdU)

A colorimetric immunoassay (ELISA) was used for the quantification of cell proliferation (Granado-Serrano et al., 2007). This method is based on the measurement of BrdU incorporation into genomic DNA during DNA synthesis of proliferating cells. HepG2 cells were seeded (10⁴ cells per well) in 96-well plates, grown 20 h and labelled by the addition of BrdU for 4 h. Then the anti-BrdU antibody was added and the immune complexes were quantified by measuring the absorbance at 620 nm in a microplate reader.

2.5. Cytotoxicity assay (LDH assay)

Lactate dehydrogenase leakage was carried out as previously described (Cuello et al., 2007; Granado-Serrano et al., 2006). Cell suspension (1.5 \times 10⁶ cells per plate) was sonicated to ensure breaking down the cell membrane to release the total amount of LDH. A mixture of 5 mM pyruvate, 0.35 mM NADH, and 84 mM Tris was added to the sample and read at 340 nm in a microplate ELISA reader. LDH leakage was estimated as the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content.

2.6. Determination of ROS

Cellular oxidative stress was quantified by the dichlorofluorescein (DCFH) assay using a microplate reader (Cuello et al., 2007; Granado-Serrano et al., 2006). Briefly, 5 μ M DCFH was added to the wells (2 \times 10⁵ cells per well) for 30 min at 37 °C. Then the cells were washed twice with serum-free medium and multiwell plates were immediately measured at the fixed times in a fluorescent microplate reader at excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 530 nm.

2.7. Fluorometric analysis of caspase-3 activity

Cells were lysed in a buffer containing 5 mM Tris (pH 8.0), 20 mM EDTA and 0.5% Triton X-100, as described (Granado-Serrano et al., 2006; Granado-Serrano et al., 2007). A reaction mixture contained 20 mM HEPES (pH 7.0), 10% glycerol, 2 mM dithiothreitol (DTT), 50 μ g protein per condition and 20 μ M Ac-DEVD-AMC

(N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. Enzymatic activity was monitored at an excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 440 nm.

2.8. Determination of GSH

Reduced glutathione was quantified by the fluorimetric assay of Hissin and Hill (1976). The method is based on the reaction of reduced glutathione with o-phthalaldehyde (OPT) at pH 8.0. In brief, cells were homogenized by ultrasound with 5% trichloroacetic acid and 2 mM EDTA. Lysates were clarified by centrifugation at 7000g for 30 min at 4 °C. 50 µL of supernatant were mixed with 1 M NaOH, 0.1 M sodium phosphate buffer and 10 µL OPT (10 mg/mL). Fluorescence was measured at excitation wavelength of 340 nm and emission wavelength of 460 nm. A standard curve of reduced glutathione (5 ng–1 µg) was used.

2.9. Determination of GPx, GR and CAT activities

For the assay of the GPx, GR and CAT activities, treated cells (4×10^6 cells per plate) were suspended in PBS and centrifuged at 300g for 5 min to pellet cells. Cell pellets were resuspended in 20 mM Tris, 5 mM EDTA, and 0.5 mM mercaptoethanol, sonicated, and centrifuged at 3000g for 15 min. Enzyme activities were measured in the supernatants and total protein content was measured by the Bradford reagent. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using tert-butylhydroperoxide as a substrate, coupled to the disappearance of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) by GR (Alia et al., 2006). GR activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione (Alia et al., 2006). Catalase (CAT) activity was determined by following the decomposition of H_2O_2 measured as a decrease in absorbance at 240 nm (Alia et al., 2006) and expressed as mU/mg protein.

2.10. Western blot analysis

To analyze Bcl-x, Bax, Bad, ERK, JNK and p38 protein levels, cells were lysed in 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 200 mM β -glycerolphosphate, 0.1 mM Na_2VO_4 , 2 µg/mL leupeptin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and the supernatants clarified by centrifugation at 12,000g for 10 min. Later, the protein concentration of cell lysates was analyzed, by using the Bradford reagent. Equal amounts of proteins (100 µg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Bio-Rad) that were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, Madrid, Spain) or anti-mouse (Sigma, Madrid, Spain) immunoglobulin. Western blots were developed with ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization was ensured by β -actin and bands were quantified using a scanner and accompanying software.

2.11. Statistics

Statistical analysis of data was as follows. Prior to analysis data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way analysis of variance was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$ SPSS version 19.0 was used.

Table 1

Effect of organic selenium compounds on cell viability (crystal violet assay and LDH leakage) and proliferation (BrdU assay).^a

	Crystal violet (% of viable cells)	LDH leakage (% LDH in culture media)	BrdU (% of proliferating cells)
Control	98 ± 17 ^a	4.67 ± 0.35 ^a	103 ± 9 ^a
<i>Se-methionine (SeMet)</i>			
1 µM	98 ± 15 ^a	4.54 ± 0.48 ^a	109 ± 10 ^a
5 µM	97 ± 15 ^a	5.04 ± 0.44 ^a	102 ± 5 ^a
10 µM	101 ± 17 ^a	4.18 ± 0.27 ^a	111 ± 7 ^a
25 µM	92 ± 11 ^a	4.15 ± 0.27 ^a	118 ± 10 ^a
50 µM	100 ± 15 ^a	3.94 ± 0.41 ^a	115 ± 9 ^a
<i>Selenocystine (SeCys)</i>			
1 µM	95 ± 10 ^a	4.01 ± 0.38 ^a	111 ± 10 ^a
5 µM	102 ± 11 ^a	3.81 ± 0.49 ^a	107 ± 10 ^a
10 µM	99 ± 15 ^a	4.16 ± 0.41 ^a	109 ± 11 ^a
25 µM	103 ± 15 ^a	4.48 ± 0.12 ^a	99 ± 7 ^a
50 µM	93 ± 12 ^a	4.93 ± 0.44 ^a	108 ± 7 ^a
<i>Selenium methylselenocysteine (SeMeSeCys)</i>			
1 µM	97 ± 10 ^a	4.06 ± 0.41 ^a	112 ± 10 ^a
5 µM	108 ± 19 ^a	4.15 ± 0.38 ^a	109 ± 8 ^a
10 µM	108 ± 12 ^a	3.97 ± 0.46 ^a	110 ± 7 ^a
25 µM	98 ± 17 ^a	4.35 ± 0.15 ^a	103 ± 10 ^a
50 µM	98 ± 12 ^a	4.85 ± 0.27 ^a	106 ± 6 ^a

^a Data represent the means (±SD) of 6–8 different samples per conditions. Means in a column without a common letter differ, $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of SeMet, SeCys and SeMeSeCys on cell viability and proliferation

To determine the potential effects on cell viability and proliferation of SeMet, SeCys and SeMeSeCys in HepG2, cells were exposed to a range of concentrations (0–50 µM) of the above three selenium organic compounds for 24 h.

Treatment of HepG2 cells for 24 h with any of the three organic selenocompounds evoked no changes in cell viability, as determined by the crystal violet assay and LDH leakage (Table 1), indicating that the concentrations selected for the study did not damage cell integrity during the period of incubation. Similarly, treatment with any of the three selenium compounds did not affect cell growth, indicating no impairment of cell proliferative machinery and preservation of a regular cell cycle (Table 1).

3.2. Effect of SeMet, SeCys and SeMeSeCys against MeHg-induced cell damage

As previously reported (Cuello et al., 2010), treatment with 8 µM MeHg for 24 h evoked a pronounced decrease in the percentage of living cells and a great increase in LDH activity (indicative of necrotic damage) in the culture medium, pointing to prominent cell damage (Fig. 1). Co-incubation for 24 h of HepG2 cultures with 1–25 µM of SeCys prevented cell damage induced by MeHg at concentrations higher than 5 µM, as shown by the enhanced cell viability and decreased LDH ratios when compared to MeHg-treated cells (Fig. 1). SeMet and SeMeSeCys did not counteract the MeHg-induced cell damage at any of the concentrations tested as shown by a percentage of cell viability similar to that of cells incubated with MeHg alone (Fig. 1A); however, 10–25 µM SeMet and all tested doses of SeMeSeCys seemed to avoid the potential necrotic effect evoked by MeHg, since the LDH leakage decreased when compared to MeHg-treated cells (Fig. 1B).

Given that SeCys was the selenium compound that showed a better potential protective effect against MeHg-induced toxicity in HepG2 cells, it was preferred for studying the time-dependent protective effects on redox status, apoptosis and survival/proliferation pathways against MeHg toxicity. In addition, 10 µM SeCys was the selected dose to evaluate the mentioned effects as it is considered a realistic concentration and was able to evoke a significant protection in HepG2 cells, as mentioned above.

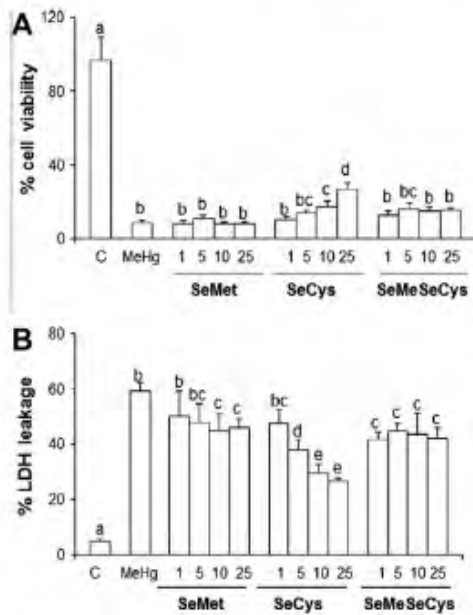


Fig. 1. Effect of selenocompounds on cell viability and LDH leakage in HepG2 cells. Cells treated with 8 μ M methylmercury (MeHg) for 24 h are positive controls. Cells were treated at 24 h with different concentrations of SeMet, SeCys, SeMeSeCys except control cells (C). (A) Cell viability was determined as percent of crystal violet-stained cells relative to untreated control. (B) Lactate dehydrogenase (LDH) values are expressed as percentage of LDH activity in the culture medium of the total activity, culture medium plus intracellular. Data represent the means (\pm SD) of 6–8 different samples per condition. For each plot, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different ($P < 0.05$).

3.3. Effect of SeCys treatment on ROS overproduction, increased caspase-3 activity and lowered GSH levels induced by MeHg

Selenium compounds and MeHg can affect the cellular redox status (Cuello et al., 2010, 2007; Mori et al., 2007); thus, ROS generation and GSH levels were evaluated after SeCys and MeHg co-treatment (24 h) in HepG2 cells. Since redox imbalance might lead to apoptotic cell death (Cuello et al., 2010), the enzymatic activity of caspase-3, which is a crucial effector in the terminal or execution phase of the apoptotic pathway, was also examined.

As shown in Fig. 2A, increased ROS generation caused by MeHg was restrained in cells treated with SeCys through the time. Thus, cells co-treated with SeCys and MeHg presented comparable levels of ROS to those of control cells after short incubation times (1–3 h), whereas ROS production increased from 4 h onwards, showing intermediate levels between those of control and MeHg-challenged cells. In addition, cells incubated with SeCys alone evoked a significant reduction of the cellular ROS generation, displaying lower levels than control cells at all tested times (Fig. 2A). On the other hand, SeCys did not affect to caspase-3 activity after 24 h of treatment, whereas caspase-3 activity was increased in the presence of MeHg (24 h). This enhancement was totally prevented by SeCys, and just at the longest incubation time (24 h, Fig. 2B) an augmented caspase-3 activity was detected.

Additionally, the concentration of GSH was evaluated. The treatment of HepG2 cells with MeHg during 24 h evoked a significant decrease in the cellular concentration of the antioxidant defence, indicating oxidative damage (Fig. 2C). Likewise, co-treatment of HepG2 cells with SeCys and MeHg for 2–4 h prevented the GSH decrease induced by MeHg. Furthermore, this co-treatment evoked an increase in GSH levels from 8 to 24 h, indicating a reduced level of oxidative damage in response to MeHg in cells that had been in the

presence of the SeCys. GSH values in cells treated with 10 μ M SeCys alone for 24 h were similar to those of untreated cells (Fig. 2C).

3.4. Effect of SeCys treatment on altered antioxidant enzyme activity induced by MeHg

To study the enzyme antioxidant defences of cells co-treated with SeCys and MeHg, the activity of GPx, GR and CAT was tested. In control cells, the presence of 8 μ M MeHg for 24 h induced a significant increase in the enzyme activity of GPx and a decrease in the enzyme activities of GR and CAT, whereas 10 μ M SeCys induced an increase in the CAT activity after 24 h of incubation, remaining unchanged GPx and GR activities (Fig. 3). However, when cells were co-treated with SeCys and MeHg, the MeHg-induced increase in the enzyme activity of GPx was suppressed at short and intermediate incubation times (2–8 h), but it was not avoided at the longest times of treatment (16 and 24 h, Fig. 3A). Furthermore, incubation with SeCys and MeHg completely prevented the MeHg-induced diminished GR activity at all tested times (Fig. 3B).

In addition, cells treated with SeCys and MeHg at 2–8 h showed an enlarged activity of CAT as compared to control cells, however, the decrease induced by MeHg in the CAT activity was not

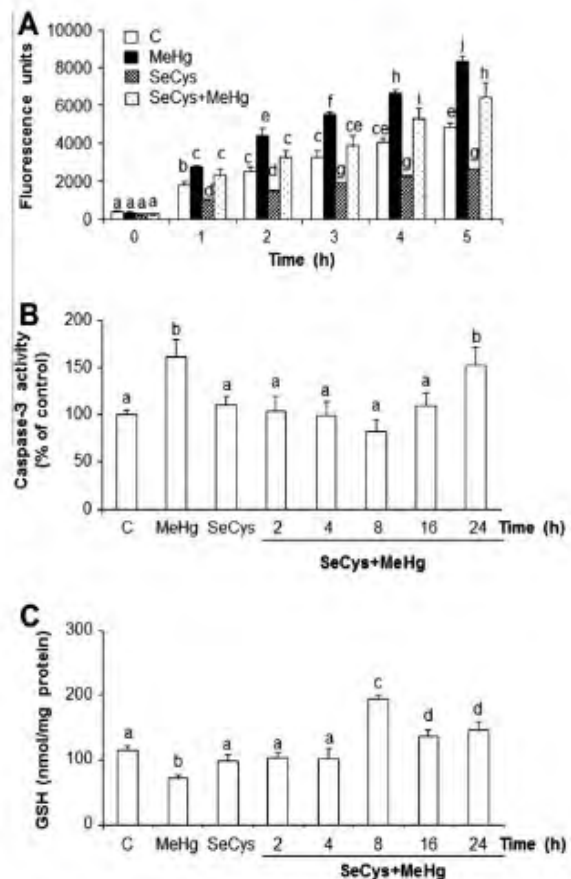


Fig. 2. Time-course of the protective effect of SeCys on ROS generation, caspase-3 activity and intracellular concentration of GSH against MeHg-induced toxicity. HepG2 cells were co-treated with SeCys and MeHg at the noted times. Cells treated with 8 μ M MeHg or 10 μ M SeCys for 24 h are positive controls and untreated cells are denoted as C. (A) Intracellular ROS production, expressed as means \pm SD of 8–10 data in arbitrary fluorescence units. (B) Caspase-3 activity and (C) Intracellular concentration of GSH are means of 6–8 different samples per condition. For each analyzed parameter, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different ($P < 0.05$).

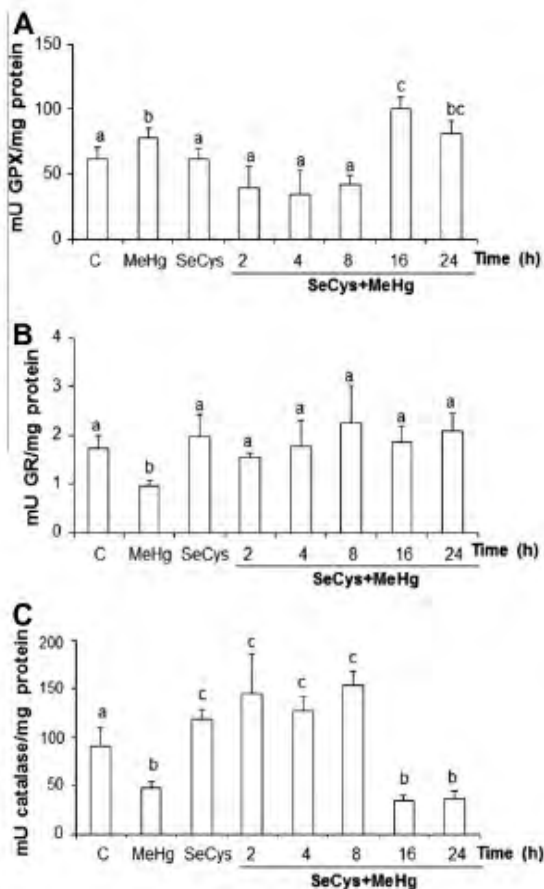


Fig. 3. Time-course effect of the SeCys and MeHg co-treatment on the activity of: (A) glutathione peroxidase, (B) glutathione reductase and (C) catalase. HepG2 cells were co-treated with SeCys and MeHg at the noted times. Cells treated with 8 μ M MeHg or 10 μ M SeCys for 24 h are positive controls and untreated cells are denoted as C. Values are means \pm SD ($n = 4-6$). For each plot, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different ($P < 0.05$).

prevented by incubating the cells with SeCys and MeHg after 16 and 24 h of treatment, and showed comparable levels to those of MeHg-treated cells (Fig. 3C).

3.5. Effect of SeCys treatment on apoptosis induced by MeHg

An imbalance in the expression of anti- and pro-apoptotic proteins is one of the major mechanisms underlying the ultimate fate of cells in the survival/apoptotic process (Granado-Serrano et al., 2006; MacFarlane and Williams, 2004). Thus, the possible modulation by SeCys and MeHg co-treatment on the expression of anti- or pro-apoptotic members of this protein family (Bcl-x, Bad, and Bax, respectively) was studied in HepG2 cells. SeCys alone did not induce a significant effect on the levels of Bcl-x_L anti-apoptotic protein or pro-apoptotic proteins (Bax and Bad) in HepG2 cells (Fig. 4). Consistent with all the above, treatment with MeHg for 24 h altered the balance among anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members (Fig. 4). Co-treatment of cells with SeCys + MeHg prevented MeHg-increased Bax levels except at the longest incubation times (16 and 24 h, Fig. 4A and B). On the contrary, SeCys and MeHg co-treatment did not counteract the enhanced values of Bad induced by MeHg, and even showed higher levels than cells incubated with MeHg alone (Fig. 4A and C). Additionally, Bcl-x_L, which has been proposed to be a caspase substrate, and the

pro-apoptotic product of Bcl-x_L cleavage, Bcl-x_S, were assayed. In this regard, MeHg-decreased Bcl-x_L/Bcl-x_S levels were restored by co-incubating the cells with SeCys + MeHg except at the longest incubation time (24 h, Fig. 4A and D).

3.6. Effect of MeHg on the MAPK signalling pathway

MAPK play an important role in cell survival/proliferation, cell death, as well as in oxidative situations (Czaja, 2003; Singh and Czaja, 2007). To investigate the time-course modulation of these proteins by MeHg treatment in HepG2, cells were incubated with 8 μ M MeHg and collected at different times. Likewise, there was no difference in the total levels of ERK, JNK and p38. Fig. 5A and B illustrate that MeHg induced the phosphorylation of ERK after a short time of incubation (2 h) to later decrease (8–24 h). On the contrary, phosphorylation of JNK increased and peaked after 8 h of incubation with MeHg to further decrease at 16 and 24 h of treatment, although the levels remained higher than those of untreated cells (Fig. 5A and C). Similarly, MeHg incubation resulted in p38 activation, evoking an increase of p38 phosphorylation after 4 h of incubation, and continued to increase up to 24 h of treatment. All these data indicated that MeHg induced a sustained enlargement in the phosphorylated levels of JNK and p38 and a transient increase in the phosphorylated levels of ERK followed by a decrease.

3.7. Effect of SeCys treatment on MAPK signalling pathways modulated by MeHg

To gain further insight into the molecular mechanisms involved in cell protection by SeCys, the modulation of MAPKs was evaluated through time in cells co-treated with SeCys and MeHg up to 24 h. As shown in Fig. 6A and B, phosphorylated levels of ERK dropped when cells were incubated with MeHg for 24 h, whereas p-ERK values increased in the presence of SeCys alone after 24 h of incubation. Interestingly, ERK remained activated in cells co-treated with SeCys and MeHg, and the increase of p-ERK was observed after 2 h of incubation and continued up to 24 h (Fig. 6A and B). As in the case of ERK, there was no change in total JNK and p38 levels in SeCys + MeHg-treated cells (Fig. 6). Phosphorylated levels of JNK and p38 remained unchanged by SeCys treatment (24 h), and co-incubation of cells showed that SeCys prevented the increase in the phosphorylated levels of both JNK and p38, except for p38 at 24 h. These results indicate that SeCys delayed the activation of JNK and p38 induced by MeHg and prevented the decrease in ERK activation stimulated by SeCys.

3.8. Role of MAPKs in the anti-apoptotic and cytoprotective effect of SeCys

Finally, it was evaluated whether the modulation of MAPKs induced by SeCys and MeHg could be implicated in the cytoprotective effect of SeCys against MeHg-induced injury. In this regard, cells were pre-treated with ERK (PD98059), JNK (SP600125) and p38 (SB203580) inhibitors for 2 h and treated with SeCys + MeHg for 24 h; then caspase-3 activity and cell viability were evaluated. As expected, treatment of cells with 10 μ M SeCys for 24 h did not affect to cell viability or caspase-3 activity, whereas 8 μ M MeHg significantly reduced the percentage of live cells and increased caspase-3 activity (Fig. 7). In SeCys + MeHg-treated cells, the reduction in the number of live cells induced by MeHg was highly prevented by SP600125 (a specific inhibitor of JNK), whereas PD98059 (a specific inhibitor of ERKs) and SB203580 (a specific inhibitor of p38) had no significant effect. In other words, the protective ability of SeCys against cellular damage caused by MeHg was eliminated in the presence of ERK and p38 inhibitors, whereas the MeHg-induced injury was prevented by

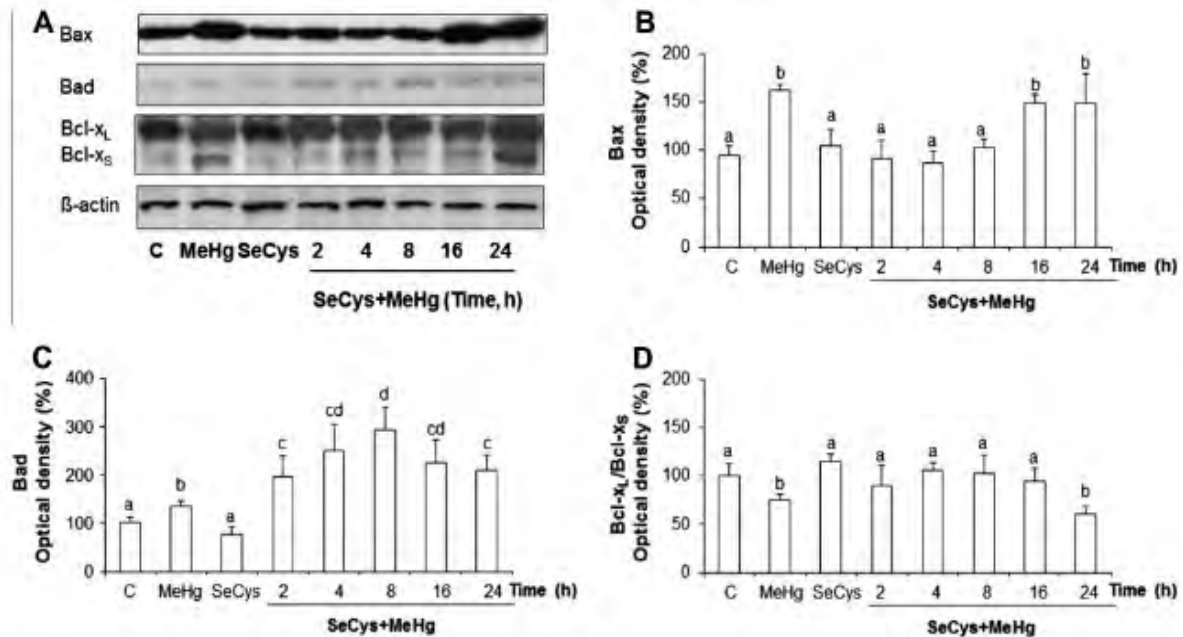


Fig. 4. Time-course effect of the SeCys and MeHg co-incubation on levels of Bcl-x_L, Bcl-x_S, Bax, and Bad. HepG2 cells were co-treated with SeCys and MeHg at the noted times. Cells treated with 8 μM MeHg or 10 μM SeCys for 24 h are positive controls and untreated cells are denoted as C. (A) Bands of representative experiments. (B) Densitometric quantification of Bax. (C) Densitometric quantification of Bad. (D) Densitometric quantification of the Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means ± SD, n = 4–6. For each analyzed parameter, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different (*P* < 0.05).

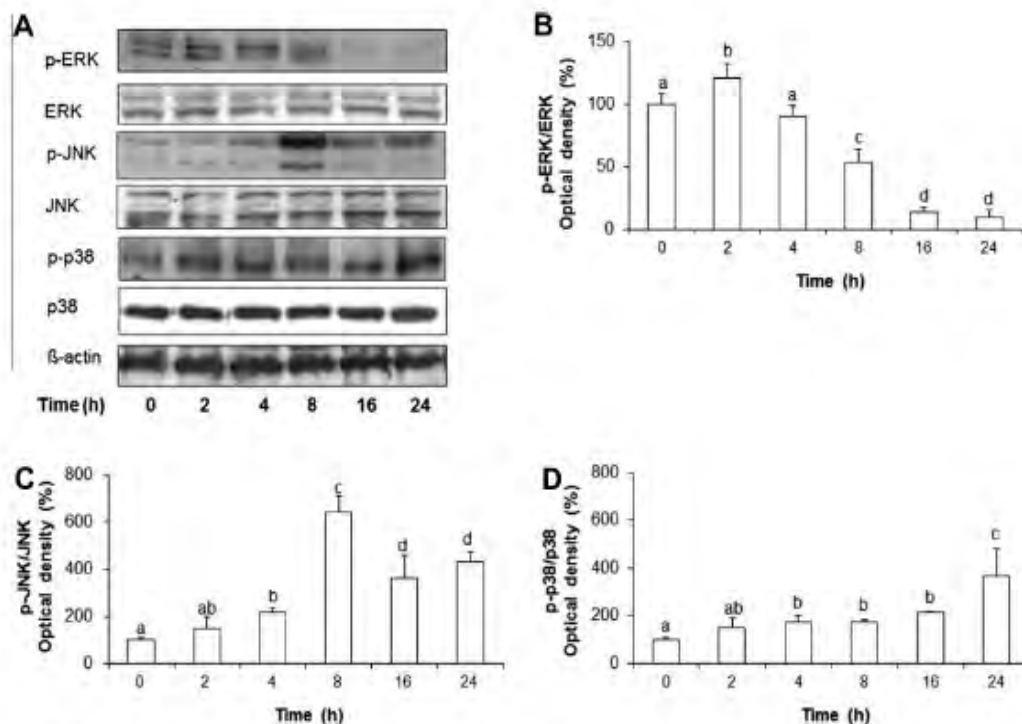


Fig. 5. Time-course effect of MeHg on levels of phosphorylated and total ERK, JNK and p38 in HepG2 cells. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p-ERK/ERK, (C) p-JNK/JNK and (D) p-p38/p38 ratios relative to controls. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means ± SD, n = 5–7. Equal loading of Western blots was ensured by β-actin. For each analyzed parameter, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different (*P* < 0.05).

inhibiting JNK. Similarly, inhibition of JNK partly counteracted the activation of caspase-3 provoked by MeHg in SeCys + MeHg-treated cells (Fig. 7B). On the contrary, in cells incubated with SeCys and

MeHg, treatment with PD98059 or SB203580 enhanced or did not have any effect on caspase-3 activation, respectively when compared to MeHg-treated cells (Fig. 7B). Taken together, these results

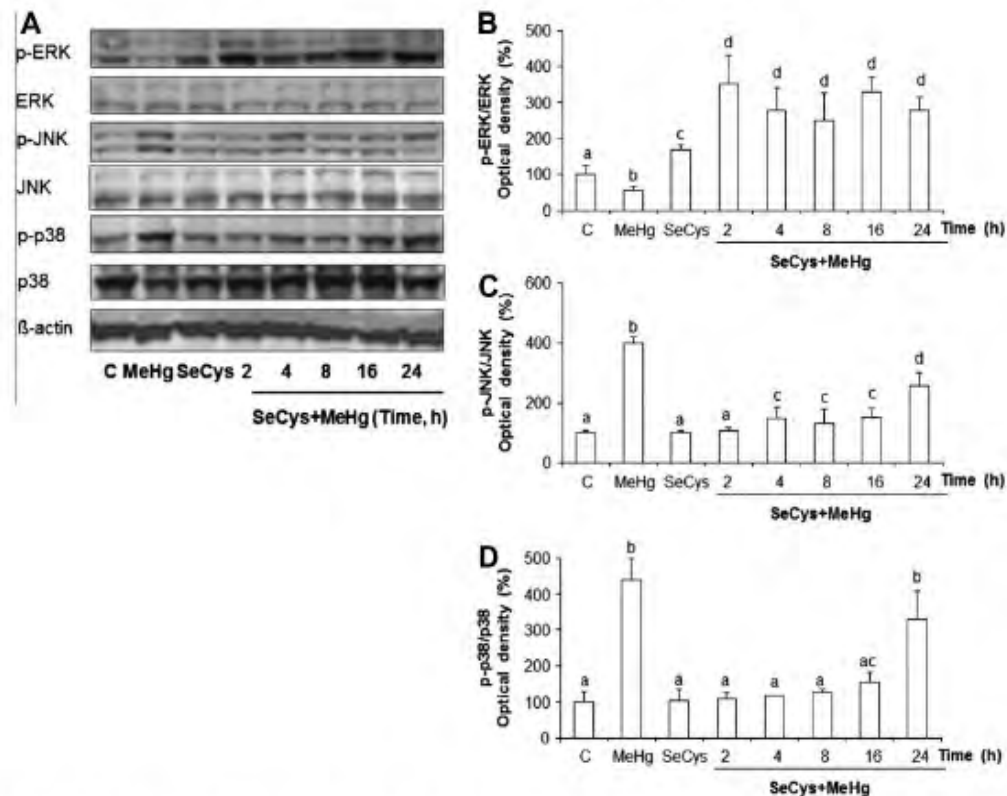


Fig. 6. Time-course effect the SeCys and MeHg co-treatment on levels of phosphorylated and total ERK, JNK and p38 in HepG2 cells. Cells were co-treated with SeCys and MeHg at the noted times. Cells treated with 8 μ M MeHg or 10 μ M SeCys for 24 h are positive controls. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p-ERK/ERK, (C) p-JNK/JNK and (D) p-p38/p38 ratios relative to controls. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means \pm SD, $n = 6-9$. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. For each analyzed parameter, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different ($P < 0.05$).

indicate that activation of the JNK pathway seems to be required for the cytotoxic effect exhibited by MeHg, whereas the stimulation of ERK and p38 seem to be involved in the protective effect of SeCys.

4. Discussion

An effective treatment to completely counteract Hg-induced toxicity is not available at present. However, the potential role of oxidative stress in MeHg-induced cell damage seems to suggest that antioxidants could be a useful tool to mitigate MeHg toxicity. Since many studies have demonstrated that heavy metals, such as Hg, induce oxidative stress (Cuello et al., 2010; de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Li et al., 2012; Lu et al., 2011; Stacchiotti et al., 2009; Watanabe et al., 2009), the utility of antioxidants, such as selenocompounds, to counteract its harmful effects is still an interesting matter of investigation. In addition, selenocompounds seem to neutralise or minimize Hg toxicity by inducing changes in the distribution, deposition and excretion of Hg (de Freitas et al., 2009; Farina et al., 2011; Korbas et al., 2010), but the molecular mechanisms for the preventive activities of the selenocompounds related to MeHg-induced damage in the liver remain largely unknown. In this study, we investigated the chemoprotective effect of different organic selenocompounds, to later focus on SeCys, against MeHg-induced cell damage. The results show that co-treatment of HepG2 cells with SeCys (10 μ M) offered a significant protection against the toxic challenge, although this effect seems to be limited for long-term exposures.

MeHg is distributed among various tissues after absorption and high concentrations of mercury have been detected in liver and

kidney followed by brain after a single administration to experimental animals (Cuello et al., 2012; Joshi et al., 2012). Therefore, liver seems to be an important target-organ for MeHg toxicity (Ashour et al., 1993; Hussain et al., 1999; Ji et al., 2005; Mori et al., 2007).

Selenium is an essential trace element which may have potent antioxidant effects *in vitro* and *in vivo*, although elevated doses of this dietary compound may also be toxic and mutagenic, and excess consumption could cause adverse metabolic reactions (Hoefig et al., 2011; Valdiglesias et al., 2010) and increase the risk for the appearance of chronic degenerative diseases (Nogueira and Rocha, 2011). Therefore, before the protective effects of the tested antioxidants are targeted, it is necessary to ensure that no direct damage is caused to the cell by the organic selenium compounds. Because no damage in cell integrity and proliferation was observed after a treatment for 24 h with any of the organic selenocompound tested at doses up to 50 μ M, it can be assumed that the range of concentrations finally selected (1–25 μ M) can be safely used to study the potential protective effect *in vitro* of selenium organic compounds against MeHg-induced cell damage. In this regard, it should be mentioned that an inhibitory effect on LDH activity induced by selenocompounds has been previously reported (Lugokenski et al., 2011). Although this feature should not be completely discarded, the concordance showed among crystal violet, BrdU and LDH assays suggests that the selected selenocompounds did not provoke any cell damage in the conditions tested. This is in agreement with previous studies in which organic selenocompound did not show cell toxicity (Aykin-Burns and Ercal, 2006; Cuello et al., 2007; Kumar et al., 2011; Nogueira and Rocha, 2011). Nevertheless,

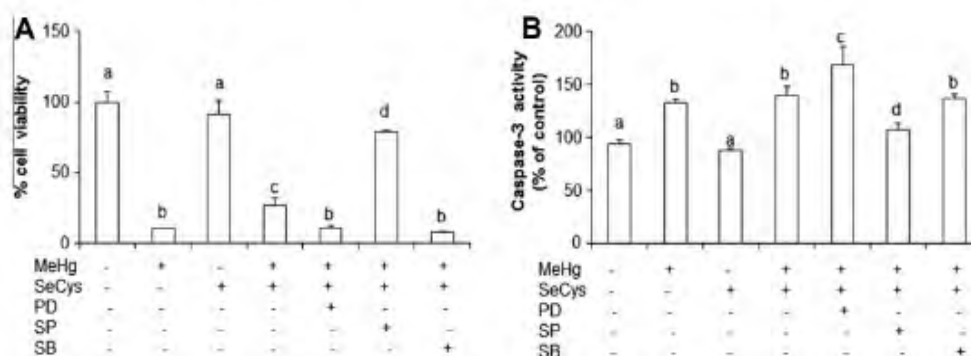


Fig. 7. Effects of SeCys and MeHg co-incubation and selective inhibitors PD98059 (PD), SP600125 (SP) and SB203580 (SB) on caspase-3 activity and cell death. HepG2 cells were co-treated with SeCys and MeHg for 24 h in the presence or absence of 50 μ M PD (ERK inhibitor) or 40 μ M SP (JNK inhibitor) or 10 μ M SB (p38 inhibitor). (A) Cells with or without inhibitors were incubated and cell death was determined by crystal violet staining. (B) Cells with or without inhibitors were incubated and caspase-3 activity was assayed as described in Section 2. Data represent the mean \pm SD of 7–10 samples. For each plot, bars with the same letter denote similar results; whereas, bars with different letters indicate data that are statistically different ($P < 0.05$).

it should be highlighted that long-term overexposures to selenium have been related with the appearance of toxic effects (Nogueira and Rocha, 2011).

Previous studies have indicated that MeHg induced a decrease of cell viability and necrotic damage at the long incubation times in hepatocytes (Ashour et al., 1993; Cuello et al., 2010; Hussain et al., 1999). However, these effects were partly prevented in the presence of organic selenium compounds (Joshi et al., 2011, 2012; Uzma et al., 2011). In the present study SeCys seemed to protect HepG2 cells against MeHg-induced damage better than SeMet and SeMeSeCys, and a concentration of 10 μ M SeCys was selected for further evaluations. In this regard, it should be mentioned that the two elements (Se and Hg) are present in quasi-stoichiometric amounts in autopsy samples from mercury miners (Kosta et al., 1975), and that the concentration range selected for this study is fairly realistic in order to evaluate the effect at the physiological level, since it has been reported steady-state concentrations around 0.7 μ M of all selenium species in human serum (Look et al., 1997), and values of organic selenium around 3.5 μ M in human brains (Korbas et al., 2010).

In addition, studies in humans and animals have described unequal efficiencies of the different selenocompounds with regard to raising tissue and blood Se concentrations (Hoefig et al., 2011; Kumar et al., 2011), and it has been suggested that the positive effects of the different selenocompounds is molecule-specific (Hoefig et al., 2011). The different selenocompounds might differ in their ability to be absorbed by the gastrointestinal tract and taken up and metabolized by hepatocytes (Hoefig et al., 2011). Thus, SeCys possessed a higher ability to reduce peroxy and hydroperoxy radicals than SeMet (Kumar et al., 2011). In this regard, SeMeSeCys and SeCys showed a similar effect on GPx activity, whereas SeMet failed to show an induction in GPX1 activity in HepG2 cells, which is also indicative of Se availability (Hoefig et al., 2011).

MeHg exerts its toxicity by increasing ROS generation, an effect that could be sufficient to induce cell death (de Melo Reis et al., 2007; Kaur et al., 2007; Shenker et al., 2002; Watanabe et al., 2009). The considerably reduced cellular ROS production evoked by SeCys is in agreement with previous papers indicating that selenocompounds are effective scavengers of hydroxyl, superoxide, and peroxy radicals (Cuello et al., 2007; Li et al., 2012; Tapiero et al., 2003; Uzma et al., 2011) and might prevent the diminished cell viability elicited by MeHg, as shown for different antioxidants (de Melo Reis et al., 2007; Joshi et al., 2011; Joshi et al., 2012; Kalender et al., 2013; Kaur et al., 2007; Uzma et al., 2011; Watanabe et al., 2009). In this line, it has been reported that in humans exposed to Hg, daily supplementation with selenium-enriched

yeast for three months decreased the urinary levels of biomarkers for oxidative stress, such as malondialdehyde and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (Li et al., 2012). In addition, it should be considered that selenium seems to reduce Hg body burden, which contributes to the protective effect against the toxic (de Freitas et al., 2009; Korbas et al., 2010). Thus, it has been suggested that demethylation of MeHg to inorganic Hg takes place in vertebrate tissues, forming unstable organoselenium-MeHg complexes that degrade to mercuric selenide and other products (Korbas et al., 2010). Additive and synergistic toxic effects for Hg and Se interactions have also been described, and increasing concentrations of Hg have been found with rising doses of Se in erythrocytes (Ort et al., 2009).

We have previously described that MeHg diminished GSH content in HepG2 cells (16–24 h), but this was preceded by an early and transient enhancement in the levels of this antioxidant defence (2–8 h) (Cuello et al., 2010; Mori et al., 2007). However, all these alterations were delayed in the presence of SeCys and an increase in GSH content was detected after 8–24 h of co-treating cells with SeCys and MeHg, pointing out to a protective effect of the organic selenocompound aimed at reducing the MeHg-induced cell damage (Joshi et al., 2012; Kunwar et al., 2011; Uzma et al., 2011). In this regard, it has been suggested that the nucleophile groups, such as selenols and thiols, present a high affinity by MeHg and might be primary targets in MeHg-induced oxidative stress (Farina et al., 2011). In addition, it was observed that co-treatment with SeCys not only prevented the decrease of GSH but also modulated the antioxidant status in HepG2 cells. These effects could probably be due to the scavenging of oxidizing free radicals by SeCys and to the induction of antioxidant enzymes, as previously reported (Kumar et al., 2011; Mishra et al., 2008). Thus, the GPx enhanced activity has been considered as a key cellular mechanism of defence against MeHg-induced cell damage (Cuello et al., 2010; Mori et al., 2007), whereas the diminished GR activity has been associated to the conjugation of MeHg with the active site of the enzyme (Ashour et al., 1993), and short exposures to the contaminant or intoxication with low MeHg doses lead to an increased activity of CAT (Filipak Neto et al., 2008; Hussain et al., 1999). Accordingly, our results revealed a delayed induction/reduction in the activity of these enzymes and a limited capacity of SeCys to maintain the preventive effects against the MeHg-induced damage in HepG2 at long-term exposures. Another interesting observation is that SeCys alone did not affect the cellular GPx and GR activities after 24 h of treatment in agreement to the effect showed by other selenium compounds like sodium selenite and SeCys in the liver and testes (Kalender et al., 2013; Uzma et al., 2011).

Redox imbalance might lead to the apoptotic cell death, and the balance in the expression of these proteins is one of the major mechanisms that determine the ultimate fate of cells in the apoptosis/survival process (Granado-Serrano et al., 2006; MacFarlane and Williams, 2004). MeHg induced an enhancement of the pro-apoptotic proteins Bax and Bad levels, as well as in the caspase-3 activity, and decreased Bcl-x_L/Bcl-x_S ratio in HepG2 cells (Cuello et al., 2010). However, all these alterations were delayed for Bcl-2 proteins and caspase-3 activity in the presence of SeCys when compared to the effects exerted by MeHg alone through the time (Cuello et al., 2010). Thus, it could be suggested that SeCys protected HepG2 cells from MeHg-induced apoptosis, as previously shown for SeCys and SeMeSeCys in the presence of pro-oxidants or heavy metals (Aykin-Burns and Ercal, 2006; Cuello et al., 2007). Therefore, co-treatment of cells with natural selenocompounds seemed to prevent the cytotoxicity induced by MeHg through the inhibition of the increase in ROS levels and the subsequent induction of apoptosis, as shown for other antioxidants (Cuello et al., 2010; Cuello et al., 2007).

MAPKs (ERK, JNK and p38) are involved in a range of cellular events, including cell growth and proliferation, cell death and cellular responses to extracellular stimuli (Czaja, 2003; Singh and Czaja, 2007). p38 and JNK are activated preferentially by cytotoxic stress and cytokines, and their role as regulators of stress-induced apoptosis has been demonstrated in the liver (Czaja, 2003; Nebreda and Porras, 2000), whereas ERK is required for cell survival (Nicholson and Anderson, 2002). In agreement with the present work, it has been demonstrated that MeHg stimulates the phosphorylation of p38 in neuroblastoma cells (Burlando et al., 2003; Posser et al., 2010), and that this effect was more pronounced in cells presenting more susceptibility to stress (Posser et al., 2010). MeHg induced JNK persistent activation, which has been directly involved in the development of apoptosis in hepatic and non-hepatic cells (Burlando et al., 2003; Hao et al., 2009; Lu et al., 2011). Conversely, sustained activation of ERK has been shown to confer hepatocyte resistance to death (Singh and Czaja, 2007). Thus, at short incubation times with MeHg an increase in the phosphorylated levels of ERK has been reported, whereas longer times of treatment with Hg or other heavy metals have been associated to decreased levels of p-ERK and cell death (Burlando et al., 2003; Hao et al., 2009; Lu et al., 2011). As previously shown with other stressors (Singh and Czaja, 2007), the decline after early activation of ERK, together with persistent activation of JNK and later activation of p38, seems to be involved in MeHg-induced cell death in HepG2 cells. In this study, we show that MeHg is able to increase the phosphorylated levels of ERK, p38 and JNK in HepG2 cells and that these events occur after increasing ROS generation and prior to caspase-3 activation and cell death.

Co-treatment of HepG2 cells with SeCys attenuated the generation of intracellular ROS induced by MeHg and prevented both the decrease in ERK activation and the increase of p-p38 and p-JNK levels that preceded cell apoptosis and death. Furthermore, our results show that the increase in the levels of p-ERK after SeCys treatment could be essential to avoid a prolonged and therefore lethal JNK activation, which is a crucial fact in hepatic cells (Czaja, 2003), and provides evidence for an anti-apoptotic role for ERK and a pro-apoptotic role for JNK in hepatic cells, as previously reported (Czaja, 2003; Singh and Czaja, 2007).

Finally, to elucidate the signalling pathway involved in the cytoprotective action of SeCys, we explored the MAPK pathway using the appropriate inhibitors. The results showed that ERK and p38 inhibitors abolished the protective effect of SeCys on MeHg-induced cell death. Thus, inhibition of ERK lead to enhanced caspase-3 activity when compared to MeHg-treated cells, which points out to the relevance of the early activation of ERK to prevent cell apoptosis and death (Singh and Czaja, 2007). Similarly,

suppression of MeHg-induced JNK activation contributes to the protective effect exerted by SeCys, as JNK inhibition greatly prevents the decreased cell viability and the increased caspase-3 activity induced by MeHg. These data suggest that ERK, JNK and p38 play a major role in mediating the protective effect by SeCys against MeHg-induced cell damage.

In summary, we show that SeCys (at the experimental conditions tested) exerts a protective effect in HepG2 cells against MeHg-induced cell damage and death, although this effect seems to be limited against a long-term induced toxicity. This preventive effect was associated with a reduced ROS generation, and with a delay in GSH decrease and apoptosis induction, as well as avoidance of ERK deactivation and p38 and JNK stimulation in HepG2 cells. Moreover, treatment of HepG2 with SeCys increased the activities GPx and CAT, and thus contributed to protect cells against MeHg-induced cell damage by directly counteracting free radicals and by activating the antioxidant defence system. Interestingly, our results provide evidence that ERK and p38 act as key mediators on the SeCys-induced cytoprotection against MeHg-induced toxicity, and that JNK is a crucial protein for the MeHg-provoked damage. These results provide new insights into the molecular mechanisms of SeCys and MeHg, and point toward the protective effect of SeCys against Hg-induced abnormalities by the ability of SeCys to modulate the redox status and key proteins related to cell stress and survival/proliferation pathways.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Grants 910382-681, CSD2007-00063 and AGL2010-17579 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and Comunidad de Madrid No. Ref.: (P2009/AGR-1464). I. Cordero-Herrera thanks to MICINN for the FPI predoctoral fellowship. S. Cuello was a fellow of the FPU predoctoral program of MEC.

References

- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A., Bravo, L., Goya, L., 2006. Quercetin protects human hepatoma cell line (HepG2) against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 110–118.
- Ashour, H., Abdel-Rahman, M., Khodair, A., 1993. The mechanism of methylmercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 69, 87–96.
- Aykin-Burns, N., Ercal, N., 2006. Effects of selenocystine on lead-exposed Chinese hamster ovary (CHO) and PC-12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 136–143.
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W.Q., Nakahodo, T., Thompson, H.J., Toscano, P.J., Uzar, H., Zhang, X., Zhu, Z.J., 2001. Allium chemistry: synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of Se-alk(en)ylselenocysteines and their gamma-glutamyl derivatives and oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* 49, 458–470.
- Burlando, B., Magnelli, V., Panfoli, I., Berti, E., Viarengo, A., 2003. Ligand-independent tyrosine kinase signalling in RTH 149 trout hepatoma cells: comparison among heavy metals and pro-oxidants. *Cell. Physiol. Biochem.* 13, 147–154.
- Cuello, S., Goya, L., Madrid, Y., Campuzano, S., Pedrero, M., Bravo, L., Cámara, C., Ramos, S., 2010. Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1405–1411.
- Cuello, S., Ramos, S., Mateos, R., Martín, M.A., Madrid, Y., Cámara, C., Bravo, L., Goya, L., 2007. Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by *tert*-butylhydroperoxide. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2167–2178.
- Cuello, S., Ximenez-Embun, P., Ruppen, I., Schonthaler, H.B., Ashman, K., Madrid, Y., Luque-García, J.L., Cámara, C., 2012. Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. *Analyst* 137, 5302–5311.
- Czaja, M., 2003. The future of GI and liver research: editorial perspectives III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G875–G879.
- de Freitas, A.S., Funck, V.R., dos Santos Rotta, M., Bohrer, D., Mörschbacher, V., Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Farina, M., Aschner, M., Teixeira Rocha, J.B., 2009.

- Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res. Bull.* 79, 77–84.
- de Melo Reis, R.A., Herculano, A.M., da Silva, M.C.C., dos Santos, R.M., do Nascimento, J.L.M., 2007. In vitro toxicity induced by methylmercury on sympathetic neurons is reverted by L-cysteine or glutathione. *Neurosci. Res.* 58, 278–284.
- Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2011. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 405–417.
- Filipak Neto, F., Zanata, S.M., Silva de Assis, H.C., Nakao, L.S., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol. In Vitro* 22, 1705–1713.
- Granado-Serrano, A., Martín, M., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Nutr.* 136, 2715–2721.
- Granado-Serrano, A., Martín, M., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S., 2007. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2020–2027.
- Hao, C., Hao, W., Wei, X., Xing, L., Jiang, J., Shang, L., 2009. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicol. In Vitro* 23, 660–666.
- Hissin, P., Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidised and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214–226.
- Hoefig, C.S., Renko, K., Köhrle, J., Birringer, M., Schomburg, L., 2011. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J. Nutr. Biochem.* 22, 945–955.
- Honda, S., Hylander, L., Sakamoto, M., 2006. Recent advances in evaluation of health effects on mercury with special reference to methylmercury: a minireview. *EHPM* 11, 171–176.
- Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J., Khan, A.T., 1999. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health B* 34, 645–660.
- Ji, X., Wang, W., Cheng, J., Yuan, T., Zhao, X., Zhang, H., Qu, L., 2005. Free radicals and antioxidant status in rat liver after dietary exposure of environmental mercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22, 309–314.
- Joshi, D., Mittal, D., Shrivastav, S., Shukla, S., Srivastav, A.K., 2011. Combined effect of N-acetyl cysteine, zinc, and selenium against chronic dimethylmercury-induced oxidative stress: a biochemical and histopathological approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 558–567.
- Joshi, D., Mittal, D.K., Shukla, S., Srivastav, A.K., 2012. Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethylmercury toxicity in male albino rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 103–108.
- Kalender, S., Uzun, F.G., Demir, F., Uzunhisarçıklı, M., Aslanturk, A., 2013. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* 55, 456–462.
- Kaur, P., Aschner, M., Syversen, T., 2007. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. *Toxicology* 230, 164–177.
- Korbas, M., O'Donoghue, J.L., Watson, G.E., Pickering, I.J., Singh, S.P., Myers, G.J., Clarkson, T.W., George, G.N., 2010. The chemical nature of mercury in human brain following poisoning or environmental exposure. *ACS Chem. Neurosci.* 1, 810–818.
- Kosta, L., Byrne, A.R., Zelenko, V., 1975. Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature* 254, 238–239.
- Kumar, B.S., Kunwar, A., Singh, B.G., Ahmad, A., Priyadarsini, K.I., 2011. Antihemolytic and peroxyl radical scavenging activity of organoselenium compounds: an in vitro study. *Biol. Trace Elem. Res.* 140, 127–138.
- Kunwar, A., Jayakumar, S., Bhilwade, H.N., Bag, P.P., Bhatt, H., Chaubey, R.C., Priyadarsini, K.I., 2011. Protective effects of selenocystine against c-radiation-induced genotoxicity in Swiss albino mice. *Radiat. Environ. Biophys.* 50, 271–280.
- Li, Y.-F., Dong, Z., Chen, C., Li, B., Gao, Y., Qu, L., Wang, T., Fu, X., Zhao, Y., Chai, Z., 2012. Organic Selenium supplementation increases mercury excretion and decreases oxidative damage in long-term mercury-exposed residents from Wanshan, China. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11313–11318.
- Look, M.P., Rockstroh, J.K., Rao, G.S., Kreuzer, K.A., Barton, S., Lemoch, H., Sudhop, T., Hoch, J., Stockinger, K., Spengler, U., Sauerbruch, T., 1997. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px)-levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, 266–272.
- Lu, T.-H., Hsieh, S.-Y., Yen, C.-C., Wu, H.-C., Chen, K.-L., Hung, D.-Z., Chen, C.-H., Wu, C.-C., Su, Y.-C., Chen, Y.-W., Liu, S.-H., Huang, C.-F., 2011. Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicol. Lett.* 204, 71–80.
- Lugokinski, T.H., Müller, L.G., Taube, P.S., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., 2011. Inhibitory effect of ebselen on lactate dehydrogenase activity from mammals: a comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Drug Chem. Toxicol.* 34, 66–76.
- MacFarlane, M., Williams, A.C., 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 5, 674–678.
- Mishra, B., Kumbhare, L.B., Jain, V.K., Priyadarsini, K.I., 2008. Pulse radiolysis studies on reactions of hydroxyl radicals with selenocystine derivatives. *J. Phys. Chem. B* 112, 4441–4446.
- Mori, N., Yasutake, A., Hirayama, K., 2007. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.* 81, 769–776.
- Nebreda, A.R., Porras, A., 2000. P38 MAP kinases: beyond the stress response. *TIBS* 25, 257–260.
- Nicholson, K., Anderson, N., 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14, 381–395.
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85, 1313–1359.
- Nwokocha, C.R., Owua, D.U., Nwokocha, M.I., Ufearo, C.S., Iwuala, M.O.E., 2012. Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 50, 222–226.
- Orct, T., Lazarus, M., Jurasović, J., Blanuša, M., Piasek, M., Kostial, K., 2009. Influence of selenium dose on mercury distribution and retention in suckling rats. *J. Appl. Toxicol.* 29, 585–589.
- Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Franco, J.L., 2010. Human neuroblastoma cells transfected with tyrosine hydroxylase gain increased resistance to methylmercury-induced cell death. *Toxicol. In Vitro* 24, 1498–1503.
- Shenker, B.J., Pankoski, L., Zekavat, A., Shapiro, I.M., 2002. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antiox. Redox Signaling* 4, 379–389.
- Singh, R., Czaja, M.J., 2007. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Gastroenterol. Hepatol.* 1, 545–548.
- Stacchiotti, A., Volti, G.L., Lavazza, A., Rezzani, R., Rodella, L.F., 2009. Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2834–2840.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 57, 134–144.
- Uzma, N., Santhosh-Kumar, B., Priyadarsini, K.I., 2011. Hepatoprotective, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of selenocystine in experimental liver injury of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 142, 723–734.
- Valdiglesias, V., Pasaro, E., Mendez, J., Laffon, B., 2010. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch. Toxicol.* 84, 337–351.
- Watanabe, J., Nakamachi, T., Ogawa, T., Naganuma, A., Nakamura, M., Shioda, S., Nakajo, S., 2009. Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 34, 315–325.

Discusión integradora

1. MERCURIO

El mercurio es un elemento, cuyas especies revisten una importante toxicidad, siendo liberado al medio ambiente a través tanto de fuentes naturales como antropogénicas. Está incluido en el listado del Programa Internacional de la Seguridad Química como uno de las sustancias químicas más peligrosas. El mercurio, una vez que ha sido liberado al medio ambiente, es capaz de transformarse por la acción de las bacterias sulfatorreductoras en metilmercurio (MeHg), el cual penetra rápidamente en las bicapas lipídicas. Los efectos nocivos del mercurio en el medio ambiente se deben a su capacidad para acumularse y biomagnificarse a través de la cadena trófica. Todas las formas químicas de mercurio presentan una elevada capacidad de acumulación, siendo el metilmercurio una de las especies que más se absorbe y acumula. Aproximadamente el 100% del mercurio que se bioacumula en peces depredadores lo hace en forma dimetilmercurio. El metilmercurio forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, con lo que la vida media de eliminación resulta larga (aproximadamente de dos años). Como consecuencia, se genera un enriquecimiento selectivo de metilmercurio (en comparación con el mercurio inorgánico) a medida que se avanza en la cadena trófica.

En la presente Tesis se ha abordado la temática del mercurio bajo diferentes puntos de vista: 1) Evaluación de su toxicidad, 2) desarrollo de metodologías analíticas para la detección del mercurio y 3) el empleo de larvas de pez cebra como posible modelo alternativo a los peces adultos para la determinación de los factores de bioacumulación.

1.1 TOXICIDAD

La toxicidad originada por el metilmercurio ha sido uno de los principales temas que se han abordado en la presente memoria. Para ello se han aplicado dos metodologías distintas: mediante el empleo de técnicas de biología celular y/o molecular y mediante el uso de técnicas de proteómica.

Técnicas de biología celular y/o molecular

En el presente estudio se han evaluado los mecanismos de toxicidad de mercurio empleando células de hepatocarcinoma humano HepG2, por ser el hígado un órgano importante que se ve afectado por la toxicidad del metilmercurio. Además, el hígado es un órgano involucrado en la desintoxicación de drogas, xenobióticos o metabolitos tóxicos.

Las células HepG2 fueron expuestas a una concentración de metilmercurio de 2 mg/L durante distintos tiempos de incubación: 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Se seleccionó la concentración de 2 mg/L en base a estudios llevados a cabo sobre viabilidad celular con distintas concentraciones de metilmercurio y distintos tiempos de incubación. Se observó que la viabilidad de las células solo se veía afectada a partir de 48 horas de exposición cuando se utilizó una concentración de metilmercurio inferior a 1 mg/L, por lo que se decidió tratar a las células con una concentración de metilmercurio superior (2 mg/L). A dicha concentración se observó una disminución de la viabilidad celular en tiempos inferiores a 48 horas. Una vez seleccionada la dosis de 2 mg/L, los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo empleando dos ensayos diferentes: El ensayo del violeta de cristal y la determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa. Mediante el método del violeta de cristal se puede valorar la masa celular total de un cultivo celular y por lo tanto es un método directo para la medición de la proliferación celular. Por otro lado, la muerte celular se puede evaluar determinando la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo por las células muertas y que se expresa como el porcentaje de la LDH liberada respecto a la actividad total presente en las células. La liberación de LDH al medio de cultivo se relaciona también con una pérdida de la integridad de la membrana celular, lo que es indicativo de una muerte por necrosis. De los resultados obtenidos en el ensayo de violeta de cristal se concluyó que la viabilidad de las células se ve afectada a partir de 8 horas de incubación con 2 mg/L de metilmercurio, y es a partir de las 16 horas cuando se afecta la membrana celular, tiempo en el que los niveles de la enzima LDH liberada al medio de cultivo aumentan respecto al de las células control lo que indica que el metilmercurio induce a muerte celular por necrosis a tiempos largos de incubación.

El hecho de que el metilmercurio sea capaz de provocar en la célula una situación de estrés oxidativo, nos indujo a evaluar si este compuesto afectaba a los

niveles de GSH, a la actividad de las enzimas antioxidantes y a la Glutation-S-Transferasa(GST) (Tabla 5). Conocida la capacidad del metilmercurio de unirse a las proteínas y péptidos por su elevada afinidad con los grupos sulfhidrilo, nos llevó a establecer si el metilmercurio era capaz de alterar los niveles de GSH cuya función principal es proteger a la célula de un posible estrés oxidativo y además es el sustrato de la GPx. Se observó una disminución de los niveles de GSH a largos tiempos de incubación (16 y 24 horas). Estudios previos aparecidos en la bibliografía han puesto de manifiesto que los niveles de GSH disminuyen debido a la capacidad del metilmercurio de formar compuestos mixtos con el GSH (-S-Hg; -S-Hg-S).

Tabla 5: Sistemas de defensa relacionados con el glutathione

Sistema de defensa	Función
Glutation reducido (GSH)	Tripéptido que actúa reduciendo diferentes peróxidos, hidroperóxidos y radicales mediante la reacción catalizada por la glutathione peroxidasa.
Glutation peroxidasa (GPx)	Descompone los peróxidos en agua (o alcohol) y simultáneamente oxida la molécula de GSH a glutathione oxidado (GSSG)
Glutation reductasa (GR)	Cataliza la reacción que restaura el glutathione a su forma reducida a expensas de equivalentes reductores en forma de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH).
Glutation-S-transferasa (GST)	Utiliza el GSH para la detoxificación de una gran cantidad de compuestos, incluyendo carcinogénicos, fármacos y productos derivados del estrés oxidativo

Los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes se pueden considerar como biomarcadores de la respuesta antioxidante. De hecho en este estudio se pudo observar que la actividad de la GPx aumentaba tras 24 h de incubación para contrarrestar el efecto pro-oxidante del metilmercurio. La actividad de GR, a ese

mismo tiempo, disminuyó debido a que el metilmercurio es capaz de unirse al sitio activo de dicha enzima. Como la GPx consume GSH, ya que es el sustrato de la enzima, y GR es la encargada de reducir el GSSG (glutathion oxidado) a GSH, el aumento de la actividad de GPx y la reducción en la actividad de GR son también responsables de la disminución de los niveles de GSH en las células incubadas con metilmercurio a parte de la unión directa entre la GSH y el metilmercurio. La GST es otra de las enzimas que se vio afectada por la presencia del metilmercurio. Se trata de una de las enzimas responsables de los procesos de detoxificación, que tienen lugar dentro de la célula, para convertir los compuestos xenobióticos hidrofóbicos o no polares en compuestos más solubles en agua y así menos tóxicos para el organismo. En concreto, GST cataliza la conjugación de los xenobióticos con GSH incrementando así el peso molecular y la solubilidad de los compuestos tóxicos. La actividad de esta enzima aumentó a las 2 horas de incubación con metilmercurio, lo que probablemente esté relacionado con un mecanismo de detoxificación por parte de la célula al intentar eliminar el metilmercurio mediante la conjugación con GSH, siendo otra de las causas de la reducción de los niveles de GSH observados en las células (**“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells . Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”**)

Para confirmar los resultados anteriores, en los que el metilmercurio produce una situación de estrés oxidativo, confirmado por los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, nos encaminamos al estudio de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que el desequilibrio entre su generación y su neutralización puede conducir a un estado de estrés oxidativo y por tanto constituiría otra forma de asegurar que el metilmercurio es capaz de alterar el estado redox de las células. Los ROS se pueden producir en:

- La mitocondria, concretamente en la cadena respiratoria.
- El citosol por la acción de la NADH oxidasa que cede electrones al oxígeno para obtener el anión superóxido.

Para localizar si los ROS se producen en la mitocondria o bien en el citosol, las células se incubaron con dos inhibidores:

- Rotenona capaz de inhibir uno de los complejos de la cadena respiratoria
- Difeniliodonio (DPI) actúa en el citosol inhibiendo la NADH oxidasa

El tratamiento de las células con rotenona produjo una recuperación la viabilidad celular casi al mismo nivel que la viabilidad en las células control, mientras que el DPI es incapaz de recuperar en las células la variación de ROS provocado por la incubación con metilmercurio. Estos resultados pusieron de manifiesto que la fuente de ROS proviene de la mitocondria y no del citosol.

Para comprobar si el metilmercurio, aparte de provocar necrosis, está implicado en la muerte celular por apoptosis, se midió la actividad de las caspasas-3, -8 y -9. La caspasa-8 no se activó en respuesta al tratamiento con metilmercurio en las células HepG2, sino que la apoptosis se indujo a través de la vía mitocondrial; se estimuló el procesamiento de las caspasas-9 y -3.

Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental relacionado en la apoptosis por vía mitocondrial. Esta familia de proteínas incluye tanto miembros pro-apoptóticos como miembros anti-apoptóticos, y el balance en la expresión de estas proteínas es uno de los principales mecanismos que determina el destino final de las células en el proceso de apoptosis/supervivencia. Al aumentar el tiempo de exposición celular a metilmercurio se observó una disminución de la relación entre Bcl-X_L y Bcl-X_S (es la relación entre una proteína anti-apoptótica y pro-apoptótica respectivamente) disminución que coincidió con la activación de la caspasa-9. La expresión de las proteínas apoptóticas Bax y Bad, proteínas pro-apoptóticas, aumentó de las 4h hasta las 16 horas de incubación con metilmercurio.

Este trabajo pone de manifiesto que el MeHg induce un estrés oxidativo que es el responsable de la activación de las señales de muerte celular, involucrando a la mitocondria como principal órgano afectado por el MeHg. El análisis de los marcadores de citotoxicidad y estado redox (LDH y ROS), así como de las proteínas implicadas en la muerte celular programada (caspasas y miembros de la familia de genes *bcl-2*) muestra que, además de un daño necrótico (a tiempos largos de incubación), el MeHg es capaz de inducir apoptosis en las células HepG2 a través de la activación de la ruta intrínseca de apoptosis (caspasas-9 y -3) y el desequilibrio en los niveles de los miembros pro- (Bcl-x_S, Bax, Bad) y anti-apoptóticos (Bcl-x_L) de la familia Bcl-2, corroboran los resultados de estudios previos en los que se observó que el MeHg era el responsable de la activación de la muerte celular por apoptosis, debido a un desequilibrio entre los

miembros de la familia Bcl-2 (**“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells . Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”**).

Empleo de técnicas de proteómica

Para obtener más información acerca de los mecanismos de toxicidad del metilmercurio y poder corroborar los resultados anteriores se llevaron a cabo experimentos empleando técnicas de proteómica. La finalidad de estos estudios de proteómica fue identificar los cambios en proteínas individuales o grupo de proteínas asociados a la exposición a metilmercurio. En esta parte de la Tesis, los estudios de proteómica se enfocaron empleando dos modelos biológicos: las células de hepatocarcinoma HepG2 donde se empleó SILAC para la cuantificación de proteínas desreguladas y larvas de pez cebra en el cual la estrategia elegida fue iTRAQ.

SILAC y células de Hepatoma Humano Hep G2

La técnica SILAC, como ya se ha mencionado en la introducción, se trata de una técnica de marcaje metabólico en donde se añaden aminoácidos marcados al medio de cultivo, que posteriormente serán utilizados por las células para la síntesis de las proteínas. En SILAC los aminoácidos marcados en C¹³ son lisina y arginina, lo que significa que cuando se emplee tripsina para la digestión enzimática se obtendrán péptidos marcados en C¹³. En la estrategia SILAC tenemos dos grupos de células diferentes: las que han sido suplementadas con el medio de cultivo que contiene lisina y arginina marcadas (población “pesada”), y las que crecen en un medio de cultivo carente de isótopos marcados (población “ligera”). Una vez crecidas las células, ambas poblaciones se mezclan en proporciones iguales para posteriormente seguir con el tratamiento de muestra que se estime conveniente. La identificación de las proteínas se basa en los espectros de fragmentación de al menos uno de los péptidos del par “ligero” y “pesado”, y la cuantificación relativa se lleva a cabo mediante la comparación de las intensidades de los isótopos de los péptidos intactos, obtenidos en el espectro de masas. La ventaja del marcaje metabólico es que las muestras se mezclan al principio del proceso de tratamiento de muestra, con lo que se compensan los posibles errores cometidos a lo largo del proceso analítico. En el marcaje metabólico SILAC es muy importante conocer el llamado cociente SILAC, ya que es este

valor es el que nos proporcionará la información necesaria para saber si la expresión de una determinada proteína se encuentra desregulada (sobre-expresada o inhibida). Cuando una proteína presente un cociente SILAC $R_{\text{SILAC}} = 1$, nos encontraremos ante una proteína cuya abundancia relativa es la misma en las dos poblaciones celulares. Proteínas cuyo cociente SILAC sea $1 > R_{\text{SILAC}} > 1$ representarán a proteínas cuya abundancia entre los dos estados es diferente, y por tanto, se tratará de proteínas implicadas en el proceso objeto de estudio.

Aplicando la técnica de SILAC a células expuestas a metilmercurio, podremos obtener información sobre las proteínas que se encuentran alteradas en presencia de este tóxico, obteniendo así más información acerca de la toxicidad y/o mecanismos en los que el metilmercurio se encuentra implicado.

La primera decisión que se tuvo que tomar antes de llevar a cabo el estudio fue establecer el tiempo de incubación y la dosis de metilmercurio a las que las células iban a estar expuestas. Basándonos en el estudio previo (**"Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells . Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411"**) se decidió que la dosis adecuada sería 2 mg/L de MeHg, puesto que con dosis menores se necesitan tiempos de incubación largos para observar algún efecto tóxico en las células. En cuanto al tiempo de incubación, se eligió 8 horas puesto que a ese tiempo ya se detectó daño celular por la inducción de apoptosis (alteración de niveles de Bcl₂).

Para poder obtener información acerca de las proteínas afectadas por la presencia de MeHg, se marcaron las células tratadas con MeHg (población "pesada"), y a las células control se les añadió medio de cultivo en el cual los aminoácidos estaban sin marcar (población "ligera") y una vez crecidas y extraídas las células se mezclaron en una proporción 1:1.

Antes de analizar y cuantificar las proteínas por LC-MS/MS, se realizó un fraccionamiento celular, con el fin de simplificar la complejidad de la muestra y separar la mitocondria del citosol ya que en el estudio anterior (**"Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411"**) se observó que la mitocondria es uno de los orgánulos afectados por la presencia del metilmercurio en donde los niveles de ROS aumentan, y además

durante la apoptosis se puede producir la translocación, de distintas proteínas, entre la mitocondria y el citosol.

Tanto las proteínas del citosol como las de mitocondria se separaron mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE) seguido de digestión trípica para obtener, así, los péptidos, los cuales fueron extraídos y separados mediante nanoHPLC. El trabajar con nanoHPLC proporciona una serie de ventajas respecto a la cromatografía convencional:

- Se reduce drásticamente el consumo de disolventes contribuyendo al desarrollo de la química limpia

- La disminución del diámetro interno de la columna analítica incrementa la sensibilidad y disminuye la cantidad de muestra necesaria. Este aspecto es especialmente importante para la identificación de proteínas poco abundantes.

- La disminución del tamaño de partícula del empaquetamiento cromatográfico se traduce en un estrechamiento de los picos cromatográficos aumentándose, por tanto, la eficacia de la separación. Este aspecto es muy importante para poder conseguir la resolución cromatográfica necesaria en las diferentes estrategias de cuantificación de proteínas.

- La disminución del caudal y del diámetro interno de las conexiones facilita su acoplamiento directo a la fuente de nanoelectrospray del espectrómetro de masas de manera que los péptidos se pueden detectar tras la elución de la nano-columna.

La exposición a metilmercurio originó la aparición de 78 proteínas desreguladas debido a la presencia de mercurio, de las cuales 29 estaban sobre expresadas y 49 inhibidas.

Usando la base de datos de Gene Ontology, que clasifica las proteínas en tres categorías (su función molecular, procesos biológicos en los que están implicados y localización en componentes celulares), se obtuvo que el 19% de las proteínas desreguladas se encuentran localizadas en la mitocondria, lo que concuerda con el fraccionamiento realizado durante la preparación de la muestra, que consistía en obtener por un lado la mitocondria y por otro lado el citosol, además de coincidir con el estudio previo donde la mitocondria ejerce un papel fundamental en el proceso de apoptosis. Además, examinando los procesos biológicos de las proteínas desreguladas,

se encontró que uno de esos procesos en el que MeHg se encuentra implicado es la apoptosis (con un porcentaje del 17%).

La mayoría de las proteínas alteradas y relacionadas con la apoptosis, tienen una función anti-apoptótica, lo que tiene sentido porque indica que las células se están intentado defender del daño provocado por el metilmercurio.

Uno de los grupos de proteínas que resultaron afectadas por la presencia de metilmercurio fue la familia de las proteínas de choque térmico (HSPs). Las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*), son un conjunto de proteínas que producen las células tanto de organismos unicelulares como pluricelulares, cuando se encuentran en un ambiente de estrés. El aumento de las HSP, presentes en pequeñas cantidades en todas las células, se atribuye a factores de estrés como:

- Alteración positiva o negativa de la temperatura
- Cambios en la presión osmótica.
- Presencia de sustancias tóxicas, como toxinas, quimioterapia, drogas, alcohol.
- Aumento de presión.
- Ambiente con pH extremos.
- Presencia de metales pesados.
- Traumatismos.
- Isquemia.
- Radiaciones ionizantes.

La proteína Mortalin (HSPA9) fue una de las proteínas de esta familia en la que se detectó un cociente SILAC muy elevado (8.43). Es importante resaltar que estudios previos realizados por otros autores detectaron su alteración por la presencia de arsénico y de mercurio.

A parte de las HSPs hay otras dos proteínas con función anti apoptótica: Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDI) y caseinkinase II (CSNK2A1), ambas proteínas se encontraron sobre expresadas en presencia de mercurio, encontrándose dentro de las 5 proteínas con cocientes SILAC más elevados: 9.98 y 8.29 respectivamente. Las dos proteínas podrían ser biomarcadores de exposición a metilmercurio, pero para confirmarlo se deberían llevar a cabo estudios para saber si

se trata de una respuesta específica de la célula al metilmercurio o simplemente se trata de un mecanismo general de defensa de las células cuando están sometidas a factores de estrés o en contacto con otros metales pesados.

Ya se mencionó anteriormente que el metilmercurio es capaz de provocar la apoptosis por la vía intrínseca (activando las caspasas 9 y 3) y no por la vía extrínseca, ya que la caspasa 8 no se vio activada. Una evidencia más acerca de este hecho es que dentro de las proteínas inhibidas se vieron afectadas Metaxin 1 Isoform 1 (MTX1) y TNF receptor-associated protein 1, ambas proteínas están relacionadas con la activación de la caspasa-8.

Las características neurotóxicas del metilmercurio son bastante conocidas. En el presente trabajo se han encontrado inhibidas proteínas relacionadas con desórdenes neurodegenerativos: Archainisoform 1 (ARCN1) y proteínas de la familia Rab.

Otras proteínas que se vieron afectadas por la presencia de metilmercurio están relacionadas con la mitocondria y la cadena de transporte electrónico, provocando así un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los resultados obtenidos por SILAC coinciden con lo que se observó en el estudio anterior: que el metilmercurio es capaz de provocar un aumento de los niveles de ROS en la mitocondria.

Gracias a los datos obtenidos con el experimento SILAC, se han podido confirmar los resultados del estudio anterior **“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”** en el que se usaron técnicas de biología molecular para tratar de explicar los mecanismos de toxicidad que provoca el metilmercurio. Esto pone de manifiesto que la técnica de SILAC resulta útil a la hora de investigar mecanismos de defensa y toxicidad que provocan los metales, incluso puede servir para hallar nuevos biomarcadores.

iTRAQ y larvas de pez cebra

Las larvas de pez cebra constituyen el segundo modelo que empleado para llevar a cabo estudios sobre los efectos nocivos que provoca el metilmercurio. En este área, la mayoría de los estudios emplean animales de experimentación, donde los mamíferos –fundamentalmente ratones – han sido utilizados para modelizar

enfermedades humanas y para estudiar el efecto beneficioso o terapéutico de fármacos y nutraceuticos. Sin embargo, la creciente demanda de animales para este tipo de estudios, junto a las presiones contra la experimentación animal, han provocado que muchas investigaciones toxicológicas se realicen directamente sobre cultivos celulares, ensayos rápidos y económicos, pero cuya eficacia ha sido cuestionada tanto por la frecuencia de resultados erróneos como por su incapacidad de determinar los efectos sobre un órgano específico. Ante la necesidad desarrollar métodos rápidos y fiables de comprobación de los posibles efectos tóxicos de las sustancias químicas, se han empezado a optimizar metodologías empleando el pez cebra. Este pez presenta varias ventajas, las cuales han hecho que sea un candidato adecuado para los estudios de toxicidad:

- Por su particular biología, permite trabajar, bien a nivel embrionario o bien con formas adultas.
- La utilización de formas embrionarias reduce los inconvenientes éticos asociados a la experimentación animal (según recoge el Real Decreto 1201/2005) y permite realizar estudios de forma extremadamente rápida y a gran escala.
- Comparte un alto porcentaje de genes con el hombre (alrededor del 80%) y su genoma está prácticamente secuenciado.

En los ensayos toxicológicos donde se emplean embriones de pez cebra su incubación o exposición a la acción de agentes tóxicos se realiza 'in vivo' en presencia los xenobióticos de interés y se evalúan y cuantifican los posibles efectos adversos (malformaciones, mortalidad) en momentos cruciales de su desarrollo. Dado que en este campo los efectos no resultan tan agresivos como en toxicología ambiental, este método debe incluir herramientas más sofisticadas como la genómica que permite el estudio simultáneo de miles de genes y sus patrones de expresión para detectar posibles cambios relacionados con la toxicidad. La toxicogenómica presenta un gran potencial en la detección de patrones de toxicidad, la identificación de biomarcadores asociados o el estudio de los mecanismos de toxicidad. La proteómica constituye otra interesante herramienta ya que extiende este estudio a las proteínas, verdaderas moléculas funcionales del metabolismo (enzimas) que intervienen en todo tipo de

procesos biológicos. De hecho, uno de los artículos de la presente Tesis ("**Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. Analyst 137 (2012) 5302-5311**"), y cuyos resultados se discutirán a continuación, está basado en el empleo de la proteómica (en particular de la técnica de iTRAQ) para estudiar los efectos tóxicos que produce el mercurio.

Al trabajar con larvas de pez cebra (en nuestro caso 6 días post-fecundación), la técnica de marcaje más sencilla es el iTRAQ. Sin embargo, si se hubiese empleado SILAC, los aminoácidos marcados se tendrían que haber añadido a través de la dieta, y en el caso de las larvas de pez cebra con 6 días post fecundación (dpf) no hubiese sido posible, puesto que no requieren de una fuente externa de nutrientes ya que hasta los 7 dpf su alimentación es puramente endógena, pues adquieren los nutrientes del propio saco vitelino. Dicho esto, si se quisiera usar la estrategia de SILAC con los embriones de pez cebra, se tendrían que alimentar a los peces adultos con una dieta especial que contuviese los aminoácidos marcados para que así las crías tuvieran en su proteoma proteínas marcadas, lo que conlleva tiempo y dinero, además esto no asegura que el marcaje sea del 100% y que los embriones se desarrollen de manera normal. En la bibliografía se recoge un estudio en el que se empleó SILAC⁴⁰¹, para ello, se alimentaron a peces cebra durante 4 meses con una dieta especial (¹³C₆-Lys - or ¹²C₆-Lys SILAC-Mouse Diet). El máximo marcaje de proteínas que se obtuvo fue de un 40% y además las hembras de pez cebra experimentaron cambios en la puesta de los embriones, lo que indica que el alimentar a los peces con una dieta diferente puede introducir cambios que podrían afectar a la interpretación de los resultados.

Por otro lado, otra de las ventajas de la técnica de iTRAQ es que permite la comparación de más de dos muestras en paralelo, pudiéndose llegar incluso a comparar hasta 8. Esto nos sirvió para poder comparar larvas control, con larvas expuestas a 5 µg L⁻¹ y 25 µg L⁻¹, para así estudiar la dependencia de la concentración de metilmercurio con la expresión de las proteínas.

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), en concreto con La Unidad de Proteómica que cuenta con experiencia en análisis cuantitativos usando la técnica de iTRAQ además de contar con un MALDI-TOF/TOF, que es la técnica más conveniente para los estudios de iTRAQ debido a que la resolución a masas bajas es mejor que la trampa iónica,

instrumento con el cual contamos actualmente en el grupo de investigación. Por otro lado, y como se comentó anteriormente en la introducción, la cuantificación en iTRAQ se realiza en los iones reporteros resultantes tras la fragmentación en el intervalo m/z de 113 hasta 121. Normalmente, en las trampas iónicas no se pueden detectar estos fragmentos al menos que el ion precursor sea 3 veces mayor que su correspondiente ion reportero. Para solventar lo anterior, los fabricantes de instrumentos han desarrollado recientemente estrategias con el fin de detectar los iones reporteros con la trampa iónica (por ejemplo PQD de Thermo Scientific)⁴⁰²

Otra de las ventajas de MALDI-TOF/TOF es que el espectrómetro de masas está desacoplado del cromatógrafo de líquidos, con lo que las muestras se pueden re-analizar si es requerido. En el caso de la trampa iónica, al estar acoplada con el equipo de nano cromatografía, puede darse la situación en la que se pierda la información de especies importantes que eluyen de la columna porque en ese mismo instante se están adquiriendo los espectros de MS/MS y, en este caso, a diferencia de lo que pasa con MALDI-TOF/TOF, la muestra no se puede volver a analizar.

El esquema de trabajo que se siguió en este estudio se recoge en la Figura 14. Brevemente, las larvas de pez cebra fueron incubadas con distintas concentraciones de MeHg: 0 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Transcurrido, el tiempo de exposición, se extrajeron las proteínas de cada condición, se digirieron con tripsina y se marcaron con los reactivos iTRAQ. El marcaje se realizó en dos grupos (réplica A y réplica B) de muestras para así obtener dos réplicas biológicas, ya que este tipo de muestras suelen presentar una elevada variabilidad. Una vez que el marcaje se ha producido, las larvas incubadas con distintas concentraciones de MeHg se mezclaron en proporción 1:1:1 para posteriormente seguir con el tratamiento de muestra. El tratamiento de muestra es una de las etapas clave en los experimentos de proteómica, debido a la complejidad de las muestras, al elevado número de proteínas y el amplio intervalo dinámico de concentraciones en el que se encuentran, lo que obliga al empleo de diversas técnicas de separación, donde la cromatografía líquida es una de las más empleadas. Una de las combinaciones frecuentemente utilizadas en proteómica es el empleo de la cromatografía de intercambio catiónico (SCX) seguido de fase inversa para el fraccionamiento y separación de proteomas complejos, consiguiendo así la separación de los péptidos según su carga e hidrofobicidad. Tal y como muestra el esquema de la

Figura 14, se empleó una tercera técnica de separación: isoelectroenfoque (IEF) utilizando el fraccionador Offgel Agilent 3100 de Agilent Technologies. Esta técnica resuelve proteínas y péptidos según su punto isoeléctrico (pI) consiguiendo una mayor resolución en la separación. Las fracciones resultantes quedan en disolución, lo que hace mucho más fácil su recuperación para el análisis LC/MS.

La combinación de tres técnicas de separación: IEF, SCX y fase inversa mejoran, en comparación con el MudPIT (tecnología multidimensional de identificación de proteínas) la identificación de proteínas, donde se emplea solo 2 técnicas de separación (normalmente cromatográficas). Tras el análisis de los datos obtenidos mediante SCX y IEF se identificaron 484 y 350 proteínas en la réplica A respectivamente. En la réplica B, se identificaron 389 y 339 usando las técnicas anteriormente mencionadas. Ambas técnicas resultaron complementarias puesto que solo un 38% (réplica A) y un 35% (réplica B) de las proteínas fueron identificadas en ambas SCX y IEF, lo que indica que si se emplease solo una de las dos se estaría perdiendo información del proteoma.

Se logró identificar 819 proteínas. Dentro del grupo de esas proteínas identificadas, 18 proteínas se encontraron desreguladas en el grupo de pez cebra incubado con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercurio. Mientras que en las larvas incubadas con $25 \mu\text{g L}^{-1}$ se encontraron 58 proteínas desreguladas. Concluyendo así que el aumento de la concentración de mercurio de exposición es directamente proporcional al número de proteínas desreguladas. Este hecho también se confirmó mediante los análisis histológicos, en donde los cambios morfológicos eran mayores en las larvas incubadas con $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

El desarrollo anormal de los embriones (efectos teratogénicos) evidenció la toxicidad del mercurio. De hecho, las proteínas más sobreexpresadas en este estudio están estrechamente relacionadas con el desarrollo de las larvas, además en los análisis histológicos se observó que un desarrollo tardío de los embriones debido a la presencia de metilmercurio.

Una vez más, se confirmó los resultados de los estudios previos realizados durante la presente Tesis, ya que resultaron alteradas proteínas relacionadas con la homeostasis de calcio lo que implica una generación de especies reactivas de oxígeno, que como se ha comentado previamente es uno de los efectos de la muerte celular inducida por metilmercurio. Adicionalmente, se corroboró los resultados de los

estudios previos *in vitro* con las células HepG2 (**“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”**) en donde la GST resulta alterada, ya que en el presente estudio resultó ser una de las proteínas sobre expresadas. El hecho de que el mercurio pueda producir apoptosis también se corroboró usando esta estrategia de iTRAQ ya que se han identificado y se han visto de-reguladas proteínas relacionadas con dicho proceso de muerte celular.

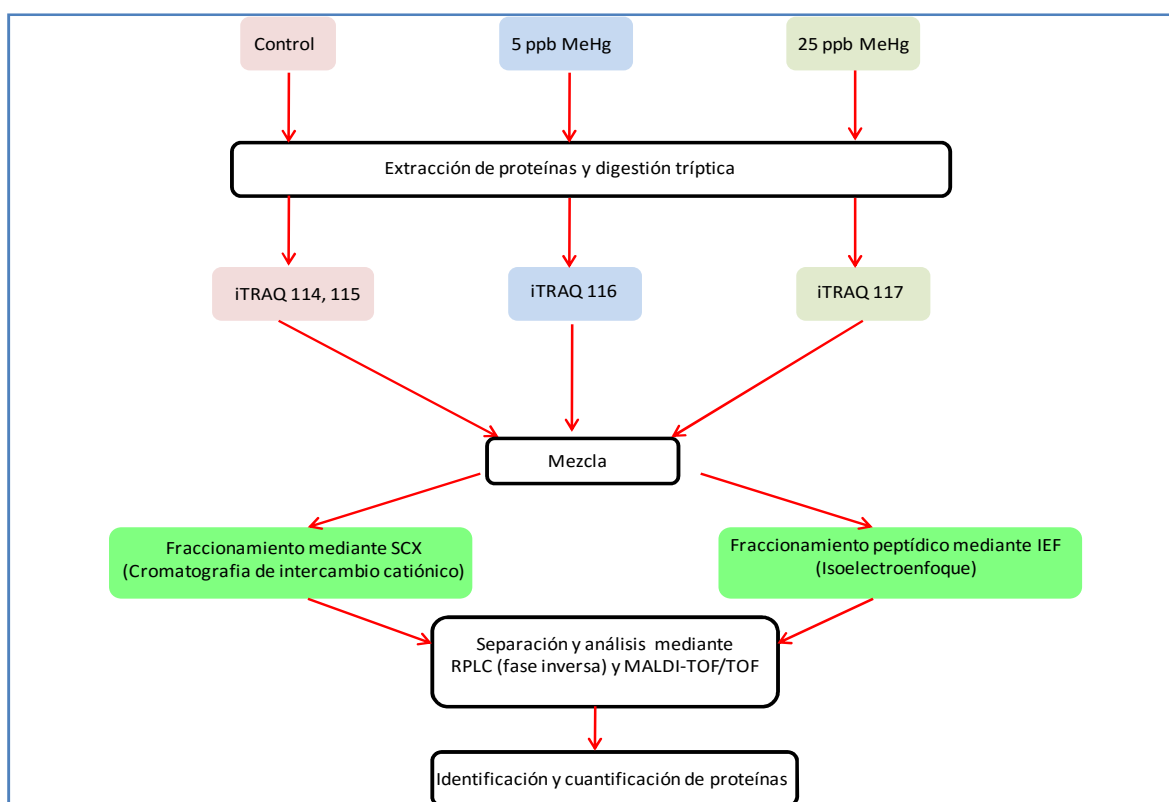


Figura 14. Esquema general de la estrategia iTRAQ

1.2 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SUS ESPECIES

Dado que el tratamiento de muestra es una de las etapas analíticas más complejas, que requiere por lo general tratamientos tediosos y largos con los correspondientes riesgos de en la presente memoria se ha optimizado el procedimiento para la extracción y especiación de mercurio utilizando una microsonda de ultrasonidos focalizada (USP) para la posterior detección de especies mercurio por ICP-MS, previa separación de sus especies mediante HPLC.

En el presente trabajo nos hemos centrado en la optimización de las condiciones experimentales de la sonda de ultrasonidos (potencia, tiempo), el tipo y concentración de los reactivos extractantes así como la cantidad de muestra a utilizar. El volumen de muestra/reactivos requerido para el trabajo con sonda de ultrasonidos depende del diámetro de la punta, cuanto menor sea el diámetro menor es el volumen que se requiere. En este estudio se empleó una sonda con una punta de 2 mm de diámetro que nos permite trabajar en un intervalo de volúmenes entre 150 μ l y 5 ml, así que en este estudio, durante la optimización del tratamiento, se compararon los resultados cuando se emplearon 50 y 5 mg de muestra (se optó por una cantidad de muestra tan pequeña porque el objetivo fundamental era su aplicación a embriones del pez cebra que como es bien sabido tienen un muy pequeño tamaño y peso).

Se compararon dos métodos diferentes de extracción de las especies de mercurio: hidrólisis ácida empleando como HCl y proteasa como medios de extracción ácida y enzimática respectivamente. Para la optimización y validación del método se empleó un material de referencia certificado en metilmercurio: CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ metilmercurio).

Para la optimización de la extracción de las especies de mercurio fueron tenidas en cuenta las siguientes variables: la concentración de HCl (1, 3, 5 y 7 mol l^{-1}), la amplitud de sonicación (40 y 60 %) y el tiempo de sonicación (5 y 10 min). Antes de realizar los estudios de especiación, se midió el contenido total del material de referencia variando las variables anteriores con el objetivo de conocer cuáles son las condiciones óptimas para una extracción cuantitativa de las especies de mercurio. Para ello, se midió el mercurio mediante la técnica de ICPMS usando un método de inyección en flujo como sistema para la introducción de la muestra, ya que el mercurio posee efecto memoria: el mercurio se retiene en el sistema de transporte al ICPMS y se va liberando lentamente con el tiempo, lo que provoca una deriva positiva de la señal del instrumento, por eso no es recomendable introducir el mercurio de manera continua en el instrumento. Como disolución portadora del sistema de inyección en flujo se empleó una disolución que contiene 2-mercaptoetanol que es capaz de complejar el mercurio y así reducir el efecto memoria. Se obtuvo una recuperación de $99 \pm 3\%$ (para 50 mg) con una concentración de HCl 7 mol l^{-1} y tiempo de sonicación de 5 min. Tiempos superiores de sonicación proporcionan volatilización de mercurio. Una

amplitud de sonicación del 40% resultó óptima para la extracción del mercurio. La recuperación obtenida con cantidades de muestra de 5 mg fue del $88 \pm 5\%$, inferior a la obtenida con 50 mg. Esta recuperación se puede considerar aceptable ya que hay que tener en cuenta la falta de homogeneidad de la muestra cuando la cantidad es muy pequeña.

La hidrólisis enzimática ofrece la ventaja de actuar específicamente en los enlaces químicos, evitando la alteración de la forma química de las especies de mercurio. Las enzimas que se emplearon fueron: proteasa XIV o una mezcla de proteasa XIV y lipasa debido al elevado contenido en grasa de las muestras de pescado en un medio reguladora pH 7.5 (pH óptimo para la actividad de las enzimas). También se combinó la proteasa con distintos ligandos sulfhidrilo (L-cysteina, 2-mercaptoetanol), ya que estos compuestos poseen una elevada afinidad por los compuestos de mercurio. El mejor porcentaje de extracción ($91 \pm 4\%$) se obtuvo utilizando como extractante una disolución de 2.5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 0.75% (w/v) de proteasa XIV y sonicando la muestra 5 min a un 40% de amplitud. Se aplicó la hidrólisis enzimática a otro tipo de muestras de pescado (mejillón y pez espada) obteniéndose recuperaciones entre el 83-89 %. También se aplicó a muestras de larvas de pez cebra, para demostrar que se puede aplicar esta metodología a pequeñas cantidades de muestra ya que el peso de los embriones de pez cebra es de entorno a 2 mg, y se consiguieron recuperaciones del 90%. Lo anterior indica que la hidrólisis enzimática mediante el empleo de la microsonda es un método capaz de extraer el mercurio de forma cuantitativa incluso en pequeñas cantidades de muestra.

Una vez conseguida la extracción cuantitativa del mercurio, el siguiente paso fue comprobar que durante el tratamiento de la muestra no se producían transformaciones de los compuestos de mercurio. Para ello, se utilizó el HPLC para la separación de los distintos compuestos de mercurio y posteriormente, como método de detección, el ICPMS. Habitualmente, para la separación de los compuestos de mercurio, se emplea la cromatografía de gases puesto que acoplada al ICPMS proporciona una sensibilidad superior que cuando se utiliza HPLC. (100 % de eficiencia en la introducción de la muestra en el ICPMS). Sin embargo, aunque el HPLC-ICPMS proporcione una sensibilidad inferior al GC-ICPMS, resulta más versátil que la cromatografía de gases ya que ofrece más mecanismos de separación sin tener que

recorrir a etapas previas de derivatización, lo cual permite conseguir una mejor separación de las especies en muestras medioambientales complejas. Además, el HPLC permite la separación de especies polares de mercurio por lo que la convierte en una buena alternativa para la separación de los compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio. Por los anteriores motivos se empleó el HPLC en vez de la cromatografía de gases. En la propia fase móvil se añadió L-cisteína para evitar la retención de los compuestos en la columna. La separación de los compuestos de mercurio es muy rápida y en tan solo 7 minutos se obtiene una buena separación entre el mercurio inorgánico y el metilmercurio. Para comprobar si durante el tratamiento de la muestra se produce interconversión de especies, se realizó la especiación del material de referencia CRM-463, el cual solo contiene metilmercurio. El cromatograma obtenido solo proporcionó un pico que se identificó como metilmercurio tras adicionar un patrón de metilmercurio a la muestra, lo que significa que durante el tratamiento de la muestra no se altera la integridad de las especies. Paralelamente se realizó la especiación de mercurio en otros pescados: mejillón, pez espada y embriones de pez cebra y se observó que solo contenían metilmercurio.

Así pues, la metodología propuesta permite llevar a cabo la extracción cuantitativa y la determinación de las especies de mercurio en tan solo 5 minutos y sin producir interconversión de especies. Otra de las ventajas del tratamiento de muestra propuesto es que permite incluso trabajar con cantidades pequeñas de muestra (entorno 2-5 mg).

1.3 BIOACUMULACIÓN EMPLEANDO LARVAS DE PEZ CEBRA

La Unión Europea (UE) puso en el año 2007 en funcionamiento la normativa REACH, un sistema integrado de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias y preparados químicos, y crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. REACH obliga a las empresas que fabrican e importan sustancias y preparados químicos a evaluar los riesgos derivados de su utilización y a adoptar las medidas necesarias para gestionar cualquier riesgo identificado. El Reglamento pretende garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y el medio

ambiente, así como fomentar la competitividad y la innovación en el sector de las sustancias y preparados químicos.

REACH requiere la evaluación del potencial de bioacumulación para priorización, es decir, para la identificación de las sustancias químicas más peligrosas. En el REACH se indica que la bioacumulación de una sustancia química en un organismo, es una de las propiedades intrínsecas más importantes que determinan el potencial peligro para el medio ambiente, y se señala que se requerirán datos del potencial de bioacumulación para un gran número de compuestos químicos con producciones superiores a las 100 Tm/año. La bioacumulación de una sustancia es un dato importante para poder clasificarla entre PBT (persistente, bioacumulativa y tóxica) o vPvB (muy persistente y muy bioacumulativa).

El término de bioconcentración se define como el proceso por el cual una sustancia química es absorbida por un organismo a través de la respiración y la superficie dérmica, y es empleado para valorar el potencial de bioacumulación. La bioconcentración se expresa mediante el denominado factor de bioconcentración (BCF), que expresa la relación entre la concentración de la sustancia química en el organismo y el medio ambiente.

De acuerdo con el Anexo XIII del REACH (2011), las sustancias que no alcanzan el criterio de bioacumulación (aquellas que su BCF es menor o igual a 2000 l/kg) se clasifican como no-bioacumulables (nB), sustancias que cumplen el criterio de bioacumulación pero cumplen el criterio de muy bioacumulables (aquellas que su BCF es mayor de 2000 l/kg pero menor o igual a 5000 l/kg) se clasifican como bioacumulables (B), y el resto de sustancias (cuyos BCF son mayores a 5000 l/kg) se clasifican como muy bioacumulables (vB). La valoración de las propiedades de bioacumulación dentro de la normativa REACH para distinguir entre sustancias B y vB, se puede realizar a través de distintos datos y/o estudios:

- a) Resultados de estudios de bioconcentración o bioacumulación en especies acuáticas.
- b) Otros datos sobre el potencial de bioacumulación, siempre que puedan demostrarse suficientemente su idoneidad y su fiabilidad, tales como: resultados de

estudios de bioacumulación en especies terrestres, resultados de estudios de toxicidad crónica en animales, etc

c) Información sobre la capacidad de la sustancia de biomagnificarse en la cadena alimentaria, a ser posible expresada en factores de biomagnificación o factores de magnificación trófica.

Centrándonos en los resultados de estudios de bioconcentración o bioacumulación en especies acuáticas, los datos que se deberán aportar son aquellos obtenidos siguiendo el único método validado actualmente, y que es el Test de Bioconcentración de la OCDE (OCDE/305), que mide la acumulación de un compuesto disuelto en agua en peces adultos. Para obtener el factor de bioconcentración (BCF) de un compuesto siguiendo ese método, es necesario realizar un complejo ensayo, cuyo coste se estima en más de 100.000 € por compuesto, siendo requeridos al menos 108 peces por ensayo para poder obtener ese dato. Ante esta situación, REACH propone que se desarrollen métodos alternativos al OCDE 305 en los cuales se pretende evitar el uso de animales para los ensayos de bioacumulación. Entre ellos, las larvas de pez cebra se han considerado como un excelente modelo para estudios de toxicología y de bioacumulación al no considerarse animales de laboratorio según la Directiva 2010/63/EU. Por este motivo uno de los trabajos de la presente Tesis es calcular los factores de bioacumulación y las posibles biotransformaciones del metilmercurio en las larvas de pez cebra con el objetivo de evaluar la posibilidad de emplear dichas larvas como alternativa al ensayo OCDE 305.

Tal y como se requiere en el ensayo OCDE 305, los ensayos de bioacumulación con metilmercurio se llevaron a cabo en dos fases: exposición (absorción), donde las larvas se exponen al metilmercurio durante 48 h y post-exposición (depuración), donde las larvas son expuestas durante 24 h a un medio que no contiene metilmercurio. La duración del experimento es una de las diferencias respecto al ensayo OCDE 305, donde la etapa de exposición puede tener una duración de 28 días, si no se consigue el equilibrio antes, o una duración de 60 días si el equilibrio no se ha conseguido tras esos 28 días y la etapa de depuración suele ser la mitad del tiempo necesario requerido en la etapa de exposición. La duración total del experimento

(exposición-depuración) para la alternativa que se propone en este trabajo es de tan solo de 72 h

Otra de las consideraciones a tener en cuenta para realizar los experimentos de bioacumulación es lo niveles de metilmercurio con los cuales se van a tratar a las larvas. Siguiendo el reglamento de la OCDE 305, el test de bioacumulación se debe realizar a dos niveles de concentración diferentes: la concentración más alta debe ser como máximo un 1% del valor de LC_{50} y la concentración más baja debe ser un 0.1% del valor de LC_{50} , siempre que sea posible detectarla con la técnica analítica que se vaya a emplear. El valor de LC_{50} para el metilmercurio es de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ con lo cual, basándose en el criterio anterior los dos concentraciones de metilmercurio deberían ser $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$, finalmente se escogieron las concentraciones de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y 1, puesto que la concentración más baja 0.25 se encuentra muy cerca del límite de detección ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) para los medios de exposición.

Para poder calcular el factor de bioconcentración necesitamos conocer los niveles de metilmercurio tanto en el medio de exposición como en las larvas, para ello el metilmercurio se cuantificó en ambos a distintos tiempos: 2, 4, 6, 24, 28, 45, 48, 50, 69 y 72 h. Para cada tiempo se empleó un total de 20-25 larvas, lo que da un total de 250 larvas lo que implica un mayor número que en el test OCDE 305. El pez cebra tiene una capacidad elevada de reproducción, cada hembra es capaz de poner 200-300 huevos por semana y el desarrollo embrionario es muy rápido, lo que permite acortar la duración de los ensayos, y, lo más importante, que los estadios más tempranos de su desarrollo (embriones y larvas de hasta seis días post-fertilización) no se consideran como animal de laboratorio, según se ha mencionado anteriormente.

La comparación de los factores de bioconcentración se compararon con los ya publicados en la literatura, utilizando dos aproximaciones diferentes

La primera aproximación fue calcular BCF a las 48 horas (la etapa final de absorción) como una relación de la concentración de mercurio en las larvas a las 48 horas respecto a la concentración en los medios de exposición.

La segunda se trata de una aproximación cinética para obtener el BCF_k (factor de bioconcentración cinético). La cinética del proceso de bioconcentración se puede describir como un modelo de dos compartimentos (agua y organismo acuático) y de

primer orden. Por lo tanto, la variación de la concentración de una sustancia química en los peces se puede describir mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f \quad (\text{Ecuación 1})$$

k_1 es la constante de la fase de exposición ($L \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$), k_2 es la constante de la fase de depuración (h^{-1}), C_w ($mg \cdot L^{-1}$) es la concentración de la sustancia química en agua, y C_f es la concentración de la sustancia química en el pez (mg/kg peso húmedo).

Si C_w es constante durante el periodo de exposición, la ecuación 1 se puede simplificar a la ecuación 2:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Cuando se alcanza el equilibrio, la ecuación 2 se puede reducir a la ecuación 3:

$$C_f/C_w = BCF_k = k_1/k_2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

La eliminación o depuración de las sustancias químicas, de los organismos acuáticos y terrestres, normalmente sigue una cinética de primer orden y que puede ser descrita por la ecuación 4:

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde $C_{f,0}$ es la concentración al inicio del periodo de depuración y k_2 , como en la ecuación 1, es la constante de depuración.

Para calcular el BCF_k es necesario representar la concentración de mercurio encontrada en las larvas (C_f) respecto al tiempo, y con ayuda de Origin v8.5 se realizó un ajuste no lineal de los datos obtenidos experimentalmente, obteniendo los valores de k_1 y k_2 de la ecuación 2 y, finalmente, BCF_k se obtuvo mediante la relación k_1 y k_2 (Ecuación 3).

Los valores de $BCF_{48\text{ h}}$ y BCF_k fueron de 1119 y 2333, respectivamente, para las larvas expuesta a $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que para las larvas expuesta a $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ los valores fueron de 3748 y 5000, respectivamente. Los valores publicados en la base de datos de ECOTOX (base de datos creada por la EPA, donde se pueden localizar datos de toxicidad de químicos en la vida acuática, plantas terrestres y vida silvestre), se encuentran en el intervalo de 1113-5900 para peces expuestos a $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. En experimentos realizados en *Oryzias latipes* se encontraron valores de 3344 para la concentración de $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ y valores entre 595-3000 para los peces expuestos a $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Se comprueba así que los valores obtenidos en el presente trabajo empleando larvas de pez cebra concuerdan con los valores ya publicados, lo que conlleva a pensar que podría ser una buena alternativa en los ensayos de bioacumulación, reduciendo así, la duración del ensayo y substituyendo los peces adultos por larvas de pez. El precio total del experimento es de unos 4.250 € (17 €/ larva) que es mucho menor que el coste estimado para llevar a cabo el test de la OCDE que asciende a unos 100.000 €.

A parte de estudiar el potencial de bioacumulación del metilmercurio se evaluó la posible interconversión de especies debido al metabolismo de las larvas. Para ello se empleó la metodología desarrollada en el trabajo anterior en el cual se emplea hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida para la extracción cuantitativa de las especies de mercurio. Utilizando ambos tratamientos de muestra se encontró solamente metilmercurio presente en las larvas de pez cebra.

2. SELENIO

El Selenio es un oligoelemento esencial para la salud humana ya que es componente de selenoproteínas, que desempeñan funciones estructurales y enzimáticas. Entre las más conocidas están sus propiedades antioxidantes. Existen evidencias en la bibliografía que indican que la deficiencia de Se puede causar efectos adversos a la salud y, además, que su aumento como componente nutricional puede otorgar protección adicional contra distintos tipos de enfermedades. Las selenoproteínas están implicadas en muchos aspectos del metabolismo celular, entre otros la enzima glutathion peroxidasa (GP_x) contiene el Se en forma del amino ácido

selenocisteína (SeCys) y es esencial para proteger a las células y tejidos del daño autooxidativo debido a la producción de radicales libres. Por otra parte, la deficiencia de Se tiene un efecto adverso sobre la inmunocompetencia, existiendo evidencia de que la suplementación de la dieta con Se mejora la respuesta inmune en humanos y que este elemento es un nutriente clave en la lucha contra determinadas infecciones virales como la influenza y VIH-SIDA.

El selenio es esencial para el éxito reproductivo de los animales y es necesario para la maduración y motilidad de los espermatozoides humanos, pudiendo asimismo reducir el riesgo de aborto espontáneo.

La deficiencia de Se está asociada con estados de ánimo negativos. Igualmente cada vez hay más evidencias de que niveles de ingesta de Se superiores a 300 µg se encuentran asociados con la reducción de riesgo del cáncer, específicamente el de hígado, próstata, colo-rectal, y de pulmón, así como la disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, disminución del estrés oxidativo, aumento de la fertilidad y de la función inmune.

Uno de los trabajos de la presente Tesis ("**Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. Anal. Bional. Chem. 389 (2007) 2167-2178**") y que se discutirá a continuación está relacionado con la capacidad antioxidante del selenio, ya que puede ser uno de los mecanismos por los que el selenio presenta propiedades anticancerígenas.

La segunda parte de la discusión integradora acerca del selenio se trata de la interacción del selenio con el mercurio ("**Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 59 (2013) 554-563**"), ya que hay estudios que revelan que el selenio es capaz de interaccionar con metales tóxicos (Arsénico, Mercurio, Cadmio y Plata) reduciendo su toxicidad, aunque el mecanismo de dichas interacciones, a día de hoy, sigue siendo una incógnita.

El último punto a tratar fue la bioacumulación de selenio, pudiendo éste bioacumularse a través de la cadena alimentaria y adquirir valores significantes a medida que se avanza en el nivel trófico en la cadena alimenticia. Es importante estudiar el fenómeno de la bioacumulación puesto que dosis elevadas de selenio

puede causar daños en los tejidos, fallo reproductivo y también efectos teratogénicos. De hecho, los elevados niveles de selenio en sistemas acuáticos ha llegado a causar la eliminación de comunidades de peces.

2.1 SE-METIL-SELENOCISTEÍNA COMO AGENTE PROTECTOR DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La capacidad antioxidante y anti carcinogénica del selenio depende de la forma química en que el Selenio se encuentra presente en la muestra. De todas las formas químicas del Selenio, la Selenometilselenocisteína (SeMeSeCys), un selenoaminoácido no proteico, es considerado por algunos autores como la forma más eficiente en su efecto antioxidante y anti carcinogénico según el mecanismo que a continuación se detalla en la Figura 15:

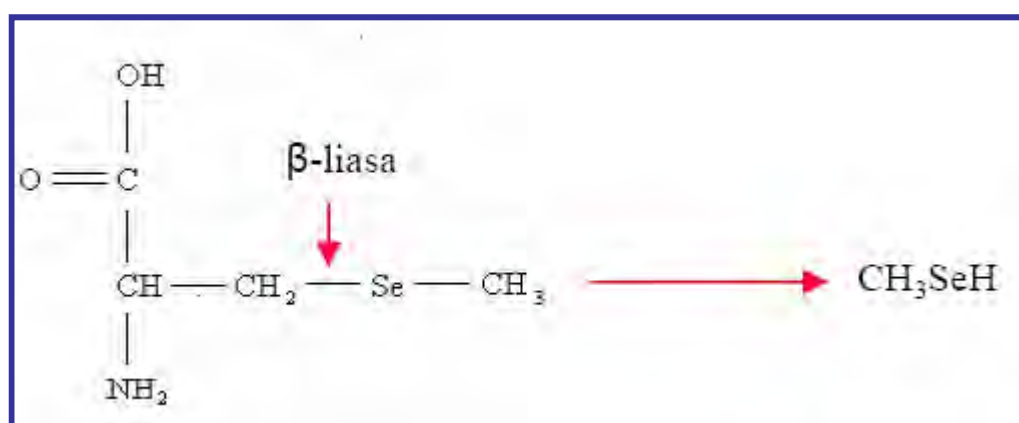


Figura 15. Reacción catalizada por β-liasa en la que se obtiene metilselenol por ruptura de la SeMeSeCys

En esta parte del trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de la SeMeSeCys en células de hepatoma humano Hep G2 sometidas a estrés oxidativo mediante el agente oxidante tert-butil hidroperóxido (*t*-BOOH). Para ello se evaluaron distintos parámetros bioquímicos: liberación de lactato deshidrogenasa, determinación de especies reactivas de oxígeno, determinación de los niveles de glutathion reducido y malondialdehído y se realizaron medidas de la actividad de la glutathion peroxidasa y glutathion reductasa, dos enzimas con un papel importante en la defensa antioxidante.

Para ello, las células se sometieron por un lado a un tratamiento con SeMeSeCys y por otro a un pretratamiento que implica la administración conjunta a las células del oxidante *t*-BOOH y SeMeSeCys. De esta forma es posible realizar la evaluación del comportamiento de la SeMeSeCys frente a los parámetros bioquímicos en comparación con las células control y el efecto antioxidante del compuesto de Selenio frente al efecto del estresante *t*-BOOH.

Al tratar las células únicamente con SeMeSeCys y evaluando distintos parámetros biológicos, se puede concluir que esta especie no causa daño celular, manteniendo así la integridad celular.

Por otra parte, la especie SeMeSeCys fue capaz de proteger a las células del daño oxidativo provocado por el *t*-BOOH.

Una vez evaluado el efecto antioxidante de la SeMeSeCys y con el fin de conocer su mecanismo de actuación se procedió a realizar estudios de especiación de Se con el fin de elucidar posibles transformaciones de la SeMeSeCys original durante el proceso de exposición en las células.

Previo a la exposición, se cuantificó el contenido total del Se en las células para poder observar diferencias en la asimilación de dicho elemento, tanto en las células tratadas como en las pretratadas con SeMeSeCys (primeramente se tratan con SeMeSeCys y luego son sometidas a un estrés con *t*-BOOH). La primera opción que se pensó para medir el contenido total de selenio fue mediante el empleo del ICP-MS después de someter a las muestras una digestión por microondas. A continuación se muestra una Tabla con algunos de los valores que se obtuvieron empleando el ICP-MS como técnica para la medida del contenido de selenio total:

Tabla 6: Concentración de los distintos isótopos de selenio

	⁸² Se (ng/g)	⁷⁷ Se (ng/g)	⁷⁸ Se (ng/g)
Trat 100 µMSeMeSeCys	16,17	48,865	213,505
Pretrat 100 µMSeMeSeCys	2,425	31,175	197,33

Examinando la Tabla anterior se desprende que, los isótopos de selenio están interferidos puesto que las concentraciones de selenio empleando distintos isótopos dan como resultado diferentes concentraciones de selenio. Esto puede ser debido al

empleo de PBS (tampón fosfato salino) en el tratamiento de las muestras, ya que el PBS es un regulador de fosfato salino que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Tanto el cloruro como el fósforo son interferentes de los isótopos 77 y 78 del selenio, según la siguiente Tabla:

Tabla 7: Interferencias de los isótopos de selenio

Isotopo de selenio	Abundancia (%)	Interferencias
74	0.89	$^{38}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{74}\text{Ge}^+$
76	9.37	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{31}\text{P}_2^{14}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}_2^+$, $^{76}\text{Ge}^+$
77	7.63	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{ArH}^+$, $^{38}\text{Ar}_2\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$
78	23.77	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{78}\text{Kr}^+$, $^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$
80	49.61	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{79}\text{BrH}^+$
82	8.67	$^{40}\text{Ar}_2\text{H}_2^+$, $^{82}\text{Kr}^+$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^+$, $^{81}\text{BrH}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{81}\text{BrH}^+$

Las interferencias provocadas por el cloruro y el fósforo conllevan a una sobreestimación de los valores de Se, ya que los isótopos 77 y 78 según la Tabla 6 da unos valores más elevados de concentraciones que el isótopo 82.

Por el motivo anterior se tuvo que emplear una metodología alternativa para la medida de selenio total cuantificándolo por generación de hidruros- fluorescencia atómica (HG-AFS), previa reducción con HCl 6M a 95°C para convertir el selenio procedente de la digestión por microondas en Se (IV), que es la única especie capaz de formar hidruros. Las concentraciones finales de Se en las células permanecieron relativamente constantes independientemente de la dosis de selenio suministrada (Tabla 8), lo que posiblemente se deba a la existencia de mecanismos de saturación. Conley y col. encontraron que tenían lugar mecanismos de saturación cuando se suministraba selenio a las células en las misma dosis⁴⁰³.

Tabla 8: Concentración de Selenio total en las células Hep G2

Muestras	Concentración de Se total($\mu\text{g/L}$)
Tratamiento con 10 μM SeMeSeCys	13.2 ± 0.2
Tratamiento con 100 μM SeMeSeCys	12 ± 1
Pretratamiento con 10 μM SeMeSeCys	12 ± 1
Pretratamiento con 100 μM SeMeSeCys	10 ± 2

^aLos resultados están expresados como el valor medio \pm desviación estándar, n=4

La especiación de selenio se llevó a cabo mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS previa hidrólisis enzimática de las células utilizando proteasa y sonda ultrasonidos, puesto que este tratamiento se ha demostrado en anteriores trabajos que es un método capaz de mantener la integridad de las especies de selenio. La SeMeSeCys se trata de un aminoácido no proteico, por lo que el empleo de proteasa en la extracción de la SeMeSeCys no es necesario. No obstante, en este estudio se empleó proteasa por si la SeMeSeCys se hubiera transformado en especies que fueran capaces de unirse a proteínas. Además de la proteasa, la digestión enzimática se realizó con la sonda de ultrasonidos, gracias a la cual el tiempo necesario para el tratamiento de las muestras se reduce drásticamente, pasando de 24 h, que es el tiempo necesario para una hidrólisis enzimática empleando un baño de ultrasonidos, hasta tan solo dos minutos. La separación y posterior detección por ICP-MS se llevó a cabo en la columna de intercambio iónico PRP-X100, caracterizada por su gran versatilidad y eficiencia de separación. La retención de las especies iónicas depende de tres variables como son; la fuerza iónica, el pH, y la naturaleza del intercambiador iónico.

Los patrones utilizados fueron: Selenocistina (SeCys_2) Selenometilselenocisteína (Se-MeSeCys), $\text{Se}(\text{IV})$, Selenometionina (SeMet), $\text{Se}(\text{VI})$ y γ -Glutamyl-Selenometilselenocisteína (γ -Glutamyl- Se-MeSeCys), cuyos tiempos de retención, son: 2.35, 3.1, 3.8, 5.5, 8.2 y 10.3 min., respectivamente.

En el análisis de los extractos celulares y tanto en las células pretratadas como en las tratadas solo apareció un único pico identificado como SeMeSeCys, indicando así que no se produce biotransformación de la SeMeSeCys en el interior de la célula. Paralelamente se llevó a cabo la especiación de selenio en los medios de cultivo, porque podría ocurrir que la SeMeSeCys se transformara en el interior de la célula y

esa nueva especie fuese desorbida encontrándose presente en el medio de cultivo. Los resultados demostraron la única existencia de SeMeSeCys.

La correcta identificación de las especies es uno de los problemas de la especiación. Una identificación inequívoca de las especies no solo debe basarse en tiempos de retención sino que deben aplicarse cromatografías alternativas. Para ello la especiación de Selenio en las células se realizó, también, por cromatografía de fase inversa. Se empleó la columna de fase inversa Phenomenex C-18.

La especiación de Se en las células con esta columna cromatográfica puso de manifiesto la presencia de un único pico correspondiente a SeMeSeCys, lo que manifiesta la identificación inequívoca de la especie.

2.2 SELENIO COMO AGENTE PROTECTOR CONTRA LA TOXICIDAD PROVOCADA POR METILMERCURIO

Para el estudio de la interacción selenio-mercurio, lo primero a decidir fue en qué tipo de modelo (muestras) se iba a estudiar dicha interacción. Se escogió el cultivo celular Hep G2, puesto que en la presente Tesis ya se habían llevado a cabo estudios de la toxicidad del mercurio y la esencialidad del selenio en este tipo de muestras.

A la hora de decidir que especies de selenio y mercurio estudiar, se decidió continuar con el metilmercurio, puesto que es el compuesto empleado en todos los artículos aquí presentados en los que se aborda la temática del mismo, además los compuestos orgánicos de mercurio son más tóxicos que el mercurio inorgánico. Respecto al selenio, y aunque ya se había estudiado el efecto de la Se-MeSeCys, se decidió incluir otros compuestos más: SeCys y SeMet, debido que estos selenoaminoácidos tienen un papel fundamental en el organismo. SeMet sirve como almacén de selenio en las proteínas, puesto que es capaz de sustituir a la metionina. Mientras que la SeCys es un aminoácido codificado genéticamente y que se encuentra en el sitio activo de varias selenoproteínas con propiedades antioxidantes. Se descartaron por completo las formas inorgánicas de selenio ya que suelen considerarse más tóxicas que las especies orgánicas.

Antes de empezar los tratamientos de las distintas especies de selenio con el metilmercurio, se evaluó si los compuestos de selenio por si solos producían daño

celular, y se observó que tratando las células con SeMet, SeCys y SeMetSeCys a varias concentraciones (0-50 μ M) durante 24 horas no provocaron cambios en la viabilidad celular.

Una vez visto que los compuestos de selenio no producen efectos tóxicos a las dosis suministradas, el siguiente aspecto importante a tratar fue el tipo de tratamiento de las especies de selenio y el metilmercurio en las células. En este trabajo se administraron conjuntamente, lo que parece ser habitual a la hora de estudiar el antagonismo mercurio-selenio.

Las dosis elegida del mercurio fue en base al estudio previo **“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”**, donde se observó que la dosis de 8 μ M MeHg a las 24 horas afectaba de manera drástica a la viabilidad celular, disminuyendo el porcentaje de células vivas y produciendo necrosis celular. Así pues, las células fueron co-tratadas con MeHg 8 μ M y las distintas especies de selenio (SeMet, SeCys y SeMeSeCys) en concentraciones dentro del intervalo 1-25 μ M durante 24 horas, para evaluar el efecto protector de estos compuestos frente al MeHg y se pudo concluir que la SeCys fue la especie que produjo una mayor protección. La dosis elegida de SeCys para los ensayos posteriores fue 10 μ M, cercana a la estequiometría 1:1 de Se:Hg, que es la relación que se ha postulado en multitud de trabajos para la protección del selenio frente al mercurio.

En el presente estudio se a evaluaron parámetros relacionados con el estrés oxidativo (ROS) y mecanismos de defensa antioxidantes (como por ejemplos los niveles de GSH) ya que uno de los mecanismos de protección del selenio que se postulan es la prevención del daño oxidativo producido por el mercurio y además son parámetros que han sido estudiados en el trabajo previo **“Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411”**. SeCys fue capaz de contrarrestar el aumento de ROS y la disminución de los niveles de GSH provocados por el MeHg, lo que concuerda con lo obtenido en uno de los estudios de la presente Tesis **“Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. Anal. Bional. Chem. 389 (2007) 2167-2178”** donde se pone de

manifiesto que los compuestos de selenio son eficaces a la hora de combatir el estrés oxidativo.

En los distintos artículos publicados durante el transcurso de esta Tesis: **"Molecular mechanisms of methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 1405-1411"**, **"Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity. Anal. Bional. Chem. 404 (2012) 315-324"** y **"Analysis of protein expression in developmental toxicity induced by MeHg in zebrafish. Analyst 137 (2012) 5302-5311"** se pone de manifiesto que la toxicidad del mercurio está relacionada con el fenómeno de apoptosis. El cotratamiento con SeCys retrasa en el tiempo el aumento de la capasa-3 y los miembros de la familia Bcl-2, indicando así que es capaz de proteger a las células de la apoptosis inducida por MeHg. Además proteínas relacionadas con las rutas de proliferación y supervivencia como son las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en concreto ERK, se vio activada en presencia de SeCys.

Sería interesante como continuación de este trabajo y para corroborar los resultados obtenidos, el realizar experimentos empleando SILAC, tal y como se hizo en el artículo publicado **"Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity. Anal. Bional.Chem. 404 (2012) 315-324"** y ver que proteínas resultan alteradas durante el cotratamiento de SeCys y MeHg.

Además de lo anterior, estudios de especiación aportarían también información adicional de la interacción Se y Hg, ya que se postula que el selenio es capaz de transformar el MeHg en formas menos tóxicas (como Hg inorgánico) o también se habla de los compuestos de Se-Hg como forma de detoxificación. Para todo lo anterior, se podría haber utilizado una cromatografía en la que se detectaran de forma simultánea compuestos de selenio y mercurio, como por ejemplo el método cromatográfico empleado en el trabajo **"Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model". Talanta 89 (2012) 169-177"**(figura 16).

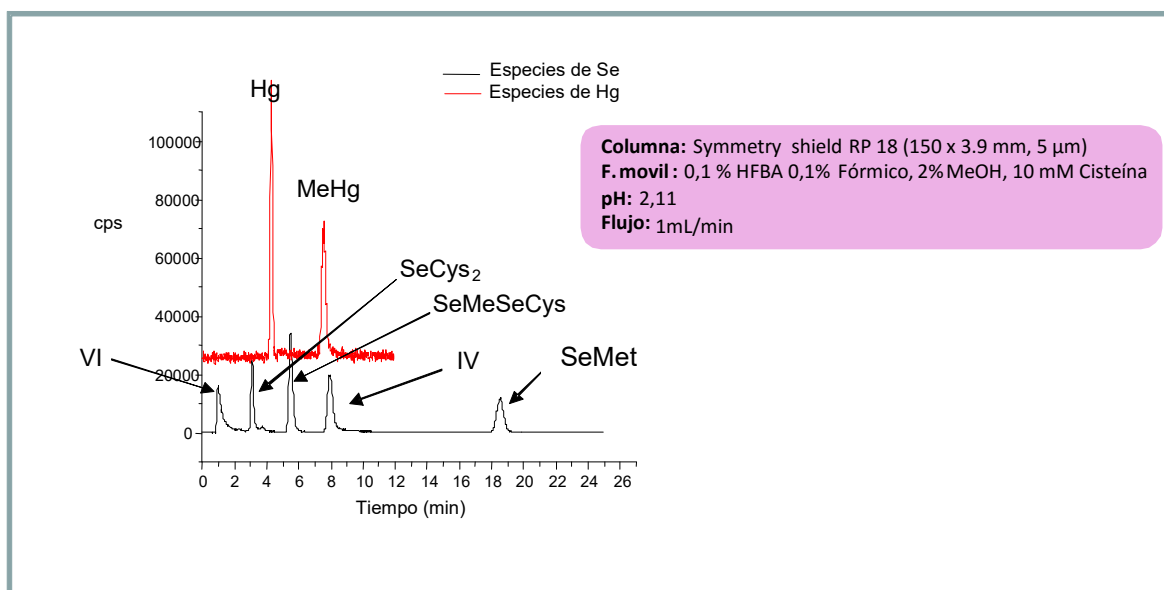


Figura 16. Separación cromatográfica de especies de selenio y mercurio de forma simultánea

2.3 BIOACUMULACIÓN EMPLEANDO LARVAS DE PEZ CEBRA

A parte del estudio del selenio como protector contra el estrés oxidativo y/o agentes tóxicos, uno de los artículos publicados durante la presente Tesis(**"Bioaccumulation and transformation of methylmercury and selenite using zebrafish (*Danio Rerio*) larvae as a model". Talanta 89 (2012) 169-177"**), trató el tema de la bioacumulación de selenio. El motivo de incluir el selenio, a la vez que se estudió el mercurio, en el mencionado artículo, está relacionado con la idea de emplear los peces cebra como modelos para determinar los factores de bioacumulación, y para asegurar que son una buena alternativa al test de la OECD 305 se deben testar distintas sustancias químicas, con distintas propiedades.

De hecho, en la presente Tesis solo se estudió la bioacumulación del selenito y del metilmercurio, pero en el grupo de investigación se han realizado estudios con diferentes sustancias química, como son:

- Metales y metaloides: metilmercurio, selenito, tributilestaño, arsenito
- Nanopartículas: de plata y de titanio
- Compuestos orgánicos: pesticidas (clorpirifos, dicofol, atracina), PAHs (antraceno y fluoreno), policlorobifenilos (PCB 104) y microbiocidas (triclosán)

Aunque la bioacumulación no es una característica muy conocida de los compuestos de selenio, es importante estudiar sus BCF ya que pueden llegar a provocar efectos tóxicos si se encuentran en elevadas concentraciones.

Las larvas se incubaron con Se (IV), puesto que las especies inorgánicas de selenio son las más abundantes y biodisponibles en los sistemas acuáticos. Las concentraciones de selenio elegidas fueron $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, sin llegar así a alcanzar el 1% del valor de LC_{50} (8.6 mg L^{-1}) que es lo que dicta el test de la OECD 305.

Tal y como se hizo con el mercurio en el mismo artículo, se trató de optimizar un método para la extracción de las especies de selenio, y sólo un 77% del selenio pudo ser extraído e identificado como selenito. Por ello, para calcular los BCFs se realizó una digestión ácida para conseguir extraer el selenio en su totalidad. Los BCFs obtenidos en este estudio, 60-74 para larvas expuestas a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y 354 para $1 \mu\text{g L}^{-1}$, concuerdan con resultados previamente publicados (35-1850). Estos resultados han permitido demostrar la aplicabilidad del modelo empleando larvas de pez cebra como una alternativa prometedora al test de OECD 305.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de esta Tesis doctoral se resumen a continuación:

- La incubación de células HepG2 con 2 mg L^{-1} de MeHg genera una situación de estrés oxidativo responsable de la activación de las señales de muerte celular primero por apoptosis (a tiempos cortos de incubación), siendo la mitocondria la principal parte de la célula afectada. Además el incremento de los niveles de ROS provocado por el metilmercurio produce una disminución de los niveles de glutathione reducido. Asimismo largos tiempos de exposición a MeHg producen no solo una gran disminución de los niveles de glutathione reducido sino también daño a la membrana, ambos fenómenos relacionados con la muerte celular por necrosis.
- El empleo de la técnica de SILAC en las células HepG2 tratadas con MeHg y el fraccionamiento celular (separación de la mitocondria del citosol) para disminuir la complejidad de la muestra, permitió corroborar los resultados anteriores e identificar las proteínas relacionadas con la toxicidad del MeHg: 17% de las proteínas estaban relacionadas con el fenómeno de apoptosis, otras estaban relacionadas con desordenes neurodegenerativos y también se identificaron proteínas relacionadas con el aumento de los niveles de ROS.
- La aplicación de la técnica iTRAQ como herramienta proteómica cuantitativa a larvas de pez cebra expuestas a MeHg, y en combinación con tres técnicas de separación (IEF, SCX y fase inversa) proporcionó una importante mejora en la identificación de proteínas afectadas por el efecto del MeHg. De los resultados se observó que hay un mayor número de proteínas diferencialmente expresadas, en las larvas tratadas con $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg. Las proteínas alteradas están relacionada con el desarrollo embrionario (hatching enzyme 1b, ZPA domain containing protein isoform 2, zona pellucida glycoprotein 3-like) y algunas otras con el estrés oxidativo (heat shock protein HSP 90-alpha 1, major vault protein). Dichos resultados fueron corroborados

mediante análisis histológicos de dichas larvas.

- Por otra parte, se desarrolló un método rápido y sencillo para la extracción cuantitativa de mercurio en muestras de pescados basado en el uso de hidrólisis ácidas (7 M HCl) y enzimáticas (15 mg proteasa XIV más 2.5% (v/v) 2-mercaptoetanol), combinado con el empleo de una micro-sonda focalizada de ultrasonidos. Se demostró la integridad de las especies de mercurio durante todo el proceso de extracción permitiendo el análisis de micromuestra (5 mg), aspecto sumamente útil en aquellos casos aquellos en que la disponibilidad de muestra es limitada o en el caso de los análisis de larvas de pez cebra.

- El empleo de las larvas de pez cebra como posible modelo alternativo al Test de Bioconcentración OECD 305 proporcionó resultados de BCFs (para Se (IV) y MeHg) concordantes con los datos publicados en la bibliografía utilizando otros modelos mucho más complejos y costosos, lo que conlleva a pensar que las larvas de pez cebra podrían ser una buena alternativa en los ensayos de bioconcentración.

- La evaluación de distintos parámetros bioquímicos en células de hepatoma expuestas únicamente a SeMeSeCys puso de manifiesto que esta especie no causa daño celular, manteniendo así la integridad celular. Los resultados obtenidos demostraron además el papel protector del compuesto SeMeSeCys frente al daño oxidativo ocasionado en las células cuando estas eran expuestas al *t*-BOOH.

- La especie selenocisteína (SeCys) fue capaz de contrarrestar el aumento de ROS y la disminución de los niveles de GSH provocados por el MeHg. El cotratamiento de las células de MeHg con SeCys origina un retraso en el tiempo del aumento de la caspasa-3 y los miembros de la familia Bcl-2, indicando así que es capaz de proteger a las células de la apoptosis inducida por MeHg. Además, proteínas relacionadas con las rutas de proliferación y supervivencia como son las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en concreto ERK, se vio activada en presencia de SeCys.

Glosario de términos

GLOSARIO DE TÉRMINOS

2-DE	electroforesis en gel de dos dimensiones
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFS	espectroscopía de fluorescencia atómica
AKT	serina/treonina quinasa
Apaf-1	factor activador de proteasas apoptóticas-1
AQUA	cuantificación absoluta de proteínas
ASE	extracción acelerada con disolventes
B	bioacumulables
Bad	bcl-2 Associated Death
Bax	proteína X asociada a Bcl-2
BCF	factor de bioconcentración
Bcl-2	factor 2 del linfoma de células B
BH	dominios de homología Bcl-2
BN	"blue Native"
CBB	azul brillante de Coomassie
CE	electroforesis capilar
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CV-AAS	espectroscopia de absorción atómica con vapor frío
CV-AFS	espectroscopía de fluorescencia atómica con vapor frío
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DEGS-PS	poliester de succinato de dietilenglicol
DI	iodotironina deiodinasa
DIGE	electroforesis diferencia en gel
DIN	nebulización directa
DISC	complejo de señalización inductor de muerte
DMDSe	dimetildiselenuros
DMSe	dimetilselenuros
DOC	carbono orgánico disuelto

dpf	días post-fecundación
DPI	difeniliodonio
DTT	ditiotreitól
ECD	detector de captura electrónica
ERK	quinasa regulada extracelularmente
ESI-MS	espectrometría de masas con ionización por electrospray
ET-AAS	espectrometría de Absorción Atómica por Atomización Electrotérmica
EtHg	etilmercurio
FADD	factor Asociado al Dominio de Muerte
FIA	análisis por inyección en flujo
GC	cromatografía de gases
GF-AAS	espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito
GPx	glutathione peroxidasa
GR	glutathione reductasa
GSH	glutathione reducido
GSSG	glutathione oxidado
GST	glutathione-S-transferasa
HFBA	ácido heptafluorobutanoico
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HSP	proteínas de choque térmico
ICAT	marcage de afinidad codificado por isótopos
ICP-AES	espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
ICPL	marcage proteico codificado por isótopos
ICP-MS	espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IEF	isoelectroenfoque
iTRAQ	marcage isobárico para cuantificación relativa y absoluta
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
LC₅₀	concentración letal 50
LDH	lactato deshidrogenasa
MAEE	extracción enzimática asistida por microondas

MALDI	desorcion/ionizacion laser asistida por la matriz
MAPKs	quinasas activadas por mitógenos
MDA	malondialdehído
Me₂Hg	dimetilmercurio
MeHg	metilmercurio
MIP-AES	espectroscopía de emisión atómica con plasma inducido por microondas
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
MudPIT	tecnología multidimensional de identificación de proteínas
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
nB	no bioacumulables
OECD TG 305	test para la determinación de la bioconcentración de las sustancias químicas en peces
p38-MAPK	quinasa activada por mitógeno p38
PBS	tampón fosfato salino
PBT	persistente, bioacumulativa y tóxica
PKCs	quinasas dependientes de fosfatidilinositol
PFPA	ácido pentafluoropropinoico
PI	fosfatidilinositoles
PI3K	fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIP₂	fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato
PIP₃	fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato
PLE	extracción con líquidos presurizados
PMF	huella peptídica
PQD	disociación de Q pulsada
QF-AAS	espectroscopia de absorción atómica con célula de cuarzo.
QSAR	relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad
RDA	dosis diaria recomendada
REACH	Registro, Evaluación y Autorización de Productos Químicos
RMN	resonancia magnética nuclear
ROS	especies reactivas de oxígeno

SCX	cromatografía de intercambio catiónico
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SEC	cromatografía de exclusión molecular
SeCys	selenocisteína
SELECT	estudio del Selenio y la Vitamina E para Prevenir el Cáncer,
Se-MeSeCys	seleno-metilselenocisteína
Se-P	selenoproteína P
Se-R	selenoproteína M
Se-W	selenoproteína W
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SILAC	marcaje con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares
SOD	superóxido dismutasa
SPE	extracción en fase sólida
SPME	microextracción en fase sólida
<i>t</i>-BOOH	tert-butil hidroperóxido
TFA	ácido trifluoroacético
TGR	tiorredoxina/glutation reductasa
TMAH	tetrametilamonio
TNF	factor de necrosis tumoral
TOF	tiempo de vuelo
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
TrxR	tiorredoxina reductasa
UE	Unión Europea
UL	consumo máximo tolerable
USP	sonda de ultrasonidos focalizada
vB	muy bioacumulables
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
vPvB	muy persistente y muy bioacumulativa
XIAP	proteína inhibidora de apoptosis ligada a X

Referencias

- ¹ U. Tinggi. *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 103.
- ² E. Gutiérrez Ríos. *Química Inorgánica*. E. Gutiérrez Ríos (Ed.). Reverté. Barcelona. 1984.
- ³ I. Nazarenko, A. Ermakov. *Analytical Chemistry of Selenium and Tellurium*. Halsted Press. New York. 1972.
- ⁴ L. Fishbein. *Metals and their compounds in the environment: Selenium*. Fishbein L. (Ed). Washington, EEUU. 1991.
- ⁵ E.J. Barán. *Química bioinorgánica*. I. Capella (Ed). McGraw Hill. Madrid. 1995.
- ⁶ L. Newland. *The handbook of environmental chemistry 3, Part B, Anthropogenic Compounds*. O. Hutzinger (Ed.). Springer, Verlag, Heidelberg. 1982
- ⁷ A. Shrift. *Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology*. D.L. Klayman, W.H.H. Gunther (Eds.) John Wiley & Sons, New York. 1973.
- ⁸ M.P. Gautier. *Analisis*. 25 (1997) 22.
- ⁹ R.H. Neal, G. Sposito. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53 (1989) 70.
- ¹⁰ J. McNeal, L.S. Balistrieri. *Selenium in Agriculture and the Environment*. L.W. Jacobs (Ed.) SSSA Special Publ. No. 23, Madison, Wisconsin, EEUU. 1989.
- ¹¹ W.T. Frankenberger, U. Karlson. *Selenium in the Environment*. W.T. Frankenberger, Jr. Benson, S. Benson (Eds). Marcel-Dekker Inc., Nueva York. 1994.
- ¹² T.C. Brown, A. Shrift. *Biol. Rev.* 57 (1982) 59.
- ¹³ H.F. Mayland, L.F. James, K.E. Panter, J.L. Sonderegger. *Selenium in Agriculture and the Environment*. L.W. Jacobs (Ed.) SSSA Special Publ. No. 23, Madison, Wisconsin, EEUU. 1989.
- ¹⁴ L. Wu. *Selenium in the Environment*. W.T. Frankenberger, Jr. Benson, S. Benson (Eds). Marcel-Dekker Inc., Nueva York. 1994
- ¹⁵ A. Läuchli. *Bot. Acta* 106 (1993) 455.
- ¹⁶ B.G. Lewis, C.M. Johnson, T.C. Broyer. *Plant Soil*. 40 (1974) 107.
- ¹⁷ J.W. Doran. *Adv. Microbial. Ecology*. 6 (1982) 1.
- ¹⁸ R.S. Oremland. *Selenium in the Environment*. W. T. Frankenberger, Jr. Benson, S. Benson (Eds). Marcel-Dekker Inc., Nueva York. 1994.

-
- ¹⁹ R.S. Oremland, J.T. Hollibaugh, A.S. Maest, T.S. Presser, L.G. Miller, C.W. Culbertson. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2333.
- ²⁰ F.A. Tomei, L.L. Barton, C.L. Lemanski, T.G. Zocco. *Can. J. Microbiol.* 38 (1992) 1328.
- ²¹ L.Lortie, W.D. Gould, S.Rajan, R.G.L. McCready, K.J. Cheng. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 4042.
- ²² M.E. Losi, W.T. Frankenberger. *Soil Sci.* 162 (1997) 692.
- ²³ B. Bennett. *Sci. Total Environ.* 31 (1983) 117.
- ²⁴ K. Schwarz, C.M. Foltz. *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 3292.
- ²⁵ J.T. Rotruck A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra. *Science.* 179 (1973) 588.
- ²⁶ U. Tinggi. *Toxicol. Lett.* 137 (2003) 103.
- ²⁷ H. Tapiero, D.M Townsend, K.D Tew. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 57 (2003) 134.
- ²⁸ R. Margis, C. Dunand, F.K. Teixeira, M. M-Pinheiro. *FEBS J.* 275 (2008) 3959.
- ²⁹ J. Gromadzinska, E. Reska, K. Bruzelius, W. Wasowicz, B. Akesson. *Eur. J. Nutr.* 47 (2008) 29.
- ³⁰ G.V. Kryukov, R. A. Kumar, A. Koc, Z. Sun, V.N. Gladyshev. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99 (2002) 4245.
- ³¹ M.P. Rayman. *Lancet.* 356 (2000) 233.
- ³² M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique. *Sci. Total. Environ.* 400 (2008) 115.
- ³³ M.A. Beck, Q. Shi, V.C. Morris, O.A. Levander. *Nat. Med.* 1 (1995) 433.
- ³⁴ C. Sappey, S. Lengrad-Poels, M. Best-Belpomme, A. Favier, B. Rentier, J. Piette. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10 (1994) 1451.
- ³⁵ M.K. Baum, G. Shor-Posner, S. Lai, G. Zhang, H. Lai, M.A. Fletcher, H. Sauberlich, J.B. Page. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 15 (1997) 370.
- ³⁶ S.Y. Yu, Y.J. Zhu, W.G. Li. *Biol. Trace Elem. Res.* 56 (1997) 117.
- ³⁷ M-W. Yu, I-S. Horng, Y-C. Chiang, Y-F. Liaw, C-J. Chen. *Am. J. Epidemiol.* 150 (1999) 367.
- ³⁸ J.W. Barrington, P. Lindsay, D. James, S. Smith, A. Roberts. *J. Obstet. Gynaecol.* 103 (1996) 130.

-
- ³⁹ J.W. Barrington, M. Taylor, S. Smith, A. Roberts. *J. Obstet. Gynaecol.* 17 (1997) 199.
- ⁴⁰ D. Behne, H. Weiler, A. Kyriakopoulos. *J. Reprod. Fertil.* 106 (1996) 291.
- ⁴¹ R. Scott, A. MacPherson. *Br. J. Urol.* 82 (1998) 2172.
- ⁴² A. Castano, A. Ayala, J.A. Rodríguez-Gómez, A.J. Herrera, J. Cano, A. Machado. 30 (1997) 549.
- ⁴³ W.C. Hawkes, L. Hornbostel. *Biol. Psychiatry* 39 (1996) 121.
- ⁴⁴ G.F. Weber, P. Maertens, X. Meng, C.E. Pippenger. *Lancet* 337 (1991) 1443.
- ⁴⁵ V. Th. Ramaekers, M. Calomme, D. Vanden Berghe, W. Makropoulos. *Neuropediatrics.* 25 (1994) 217.
- ⁴⁶ C. Berr, B. Balansard, J. Arnaud, A.M. Roussel, A. Alperovitch *J. Am. Geriat. Soc.* 48 (2000) 1285.
- ⁴⁷ J.W. Finley, J.G. Penland. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11(1998) 11.
- ⁴⁸ D. Benton, R. Cook. *Biol. Psychiatry*. 29 (1991) 1092.
- ⁴⁹ J. Néve. *J. Cardiovasc. Risk.* 3 (1996) 42.
- ⁵⁰ U. Tinggi. *Environ. Health Prev. Med.* 13 (2008) 102.
- ⁵¹ A. Perez, J. Néve, J.P. Duchateau, J.P. Famaey. *Br. J. Rheumatol.* 31 (1992) 281.
- ⁵² R. McCloy. *Digestion.* 59 (1998) 36.
- ⁵³ S.O. Shaheen, J.A.C. Sterne, R.L. Thompson, C.E. Songhurst, B.M. Margetts, P.G. Burney. *Eur. Respir. J.* 14 (1991) 141s
- ⁵⁴ R. Shaw, K. Woodman, J. Crane, C. Moyes, J. Kennedy, N. Pearce. *N. Zealand J. Med* 107 (1994) 387.
- ⁵⁵ L. Hasselmark, R. Malmgren, O. Zetterstrom, G. Unge. *Allergy* 48 (1993) 30.
- ⁵⁶ J.B. Vanderpas, B. Contempré, N.L. Duale, W. Goossens, N. Bebe, R. Thorpe, K. Ntambue, J. Dumont, C.H. Thilly, A.T. Diplock. *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 1087.
- ⁵⁷ C.B. Hymer, J.A. Caruso. *J. Chromatogr. A.* 114 (2006) 1.
- ⁵⁸ G.Q. Yang, S.Z. Wang, R.H. Zhou, S.Z. Sun. *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 872
- ⁵⁹ N. Alwahaibi, J. Mohamed. *J. Sains Kesihatan Malaysia* 6 (2008) 1
- ⁶⁰ E.J. Barán. *Química bioinorgánica*. I. Capella (Ed). McGraw Hill. Madrid. 1995.

-
- ⁶¹ L.C. Clark, G.F. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Kongrad, J.L. Leshner, H.K. Park, B.B. Sander, C.L. Smith, J.R. Taylor. *JAMA* 276 (1996) 1957.
- ⁶² S.M. Lippman, P.J. Goodman, E.A. Klein, H.L. Parnes, I.M. Thompson, A.R. Kristal, R.M. Santella, J.L. Probstfield, C.M. Moinpour, D. Albanes, P.R. Taylor, L.M. Minasian, A. Hoque, S.M. Thomas, J.J. Crowley, J.M. Gaziano, J.L. Stanford, E.D. Cook, N.E. Fleshner, M.M. Lieber, P.J. Walther, F.R. Khuri, D.D. Karp, G.G. Schwartz, L.G. Ford, C.A. Coltman. *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (2005) 94.
- ⁶³ E.A. Klein, I.M. Thompson, S.M. Lippman, P.J. Goodman, D. Albanes, P.R. Taylor, C. Coltman. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3 (2000) 145.
- ⁶⁴ E.E. Battin, J.L. Brumaghim. *Cell Biochem. Biophys.* 55 (2009) 1.
- ⁶⁵ C. Jiang, W. Jiang, C. Ip, H. Ganther, J. Lu. *Mol. Carcinogen* 26 (1999) 213.
- ⁶⁶ C. Ip, H.J. Thompson, Z. Zhu, H.E. Ganther. *Cancer Res.* 60 (2000) 2882.
- ⁶⁷ M.P. Rayman. *P. Nutr. Soc.* 64 (2005) 527.
- ⁶⁸ E.N. Drake. *Med Hypotheses* 67 (2006) 318.
- ⁶⁹ M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1.
- ⁷⁰ M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser. *Int. J. Biochem. Cell B.* 39 (2007) 44.
- ⁷¹ X. Huang. *Mutat. Res.* 533 (2003) 153.
- ⁷² B. Halliwell. *Drug. Aging.* 18 (2001) 685.
- ⁷³ W.R. Markesbery. *Free Radical Biol. Med.* 23(1997) 134.
- ⁷⁴ W.R. Markesbery, J.M. Carney. *Brain Pathol.* 9 (1999) 133.
- ⁷⁵ W.R. Markesbery, M.A. Lovell. *Antioxid. Redox Sign.* 8 (2006) 2039.
- ⁷⁶ T. Ide, H. Tsutsui, S. Hayashidani, D. Kang, N. Suematsu, K. Nakamura, H. Utsumi, N. Hamasaki, A. Takeshita. *Circ. Res.* 88(2001) 529.
- ⁷⁷ D. Steinberg. *J. Biol. Chem.* 272(1997) 20963.
- ⁷⁸ N.S. Dhalla, R.M. Temsah, T. Nettican. *J. Hypertens.* 18 (2000) 655.
- ⁷⁹ M.B. Kastan. *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 517.
- ⁸⁰ P. Kuppusamy, J.L. Zweier. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 9880.

-
- ⁸¹ H.A. Kontos, E.P. Wei, E.F. Ellis, L.W. Jenkins, J.T. Povlishock, G.T. Rowe, M.L. Hess. *Circ. Res.* 57 (1985) 142.
- ⁸² M. McIntyre, D.F. Bohr, A.F. Dominiczak. *Hypertension* 34 (1999) 539.
- ⁸³ V.J. Thannickal, B.L. Fanburg. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (2000) L1005.
- ⁸⁴ C.C. Winterbourn, M.C. Vissers, A.J. Kettle. *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000) 53.
- ⁸⁵ J. Nordberg, E.S.J. Arnér. *Free Radical Bio. Med.* 31 (2001) 1287.
- ⁸⁶ S.G. Rhee. *Exp. Mol. Med.* 31 (1999) 53.
- ⁸⁷ M. Sundaresan, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, K. Irani, T. Finkel. *Science* 270 (1995) 296.
- ⁸⁸ H.Z. Chae, H.J. Kim, S.W. Kang, S.G. Rhee. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45 (1999) 101.
- ⁸⁹ H.Z. Chae, S.W. Kang, S.G. Rhee. *Methods Enzymol.* 300 (1999) 219.
- ⁹⁰ J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro. *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595.
- ⁹¹ B. Halliwell. *Free Radic. Res.* 31 (1999) 261.
- ⁹² B. Halliwell *FASEB J.* 1 (1987) 358.
- ⁹³ Cascales Angosto, M. in *Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad.* (Ed Instituto de España) 47-90 (REALIGRAF, S.A., 1999).
- ⁹⁴ J. Viña. *Boston; CRC Press.* 1990.
- ⁹⁵ L.J Goldwater. *Mercury: A history of quicksilver.* York Press, Baltimore, MD. 1972.
- ⁹⁶ R.E. Kirk, D.F. Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology.* R.E. Kirk, D.F. Othmer (Eds.). New York. 1967.
- ⁹⁷ The Merck Index 2001. Décimotercera edición. John Wiley and Sons, New York.
- ⁹⁸ OPS (Organización Panamericana de la Salud). *Criterios de Salud Ambiental I, Mercurio.* Washington, D.C. 1978.
- ⁹⁹ W.F. Fitzgerald. *Global Biogeochemical Cycling of Mercury.* Bethesda. 1996.
- ¹⁰⁰ W.F. Fitzgerald, R.P. Manson. *Metal. Ions. Biol. Syst.* 34 (1997) 53.
- ¹⁰¹ J. Munthe. *Atmos. Environ.* 26A (1992) 1461.
- ¹⁰² E. Schuster. *Water, Air and Soil. Poll.* 56 (1991) 667.

-
- ¹⁰³ N.S. Bloom, C.J. Watras. *Sci. Tot. Environ.* 87 (1989) 199.
- ¹⁰⁴ D. Dryssen, M. Wedboorg. *Water, Air and Soil Pollut.* 56 (1991) 507.
- ¹⁰⁵ J.A Jay, F.M.M. Morel, H.F. Hemond. *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2196.
- ¹⁰⁶ H. Hintelmann, P.M. Welbourn, R.D. Evans. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 489.
- ¹⁰⁷ F.M.M. Morel, A.M.L. Kraepiel, M. Amyot. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29 (1998) 543.
- ¹⁰⁸ D.R. Baldwin, W.J. Marshall. *Ann. Clin. Biochem.* 36 (1999) 267.
- ¹⁰⁹ Health and Safety Executive. *MS12: Mercury: Medical guidance notes*. 2nd ed. London: HSE books; 1996.
- ¹¹⁰ H. Hu. Heavy metal poisoning. A.S. Fauci, E. Braunwald, K.J Isselbacher, J.D. Wilson, J.B. Martin, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo (Eds). New York. 1998.
- ¹¹¹ J.S. Casas, V. Moreno, A. Sánchez, J.L. Sánchez, J. Sordo. *Química bioinorgánica: Introducción a la toxicología metálica: Cd, Hg y Pb*. Ed. Síntesis.
- ¹¹² T. Rahola, T. Hattaula, A. Korolainen. *Ann. Clin. Res.* 5 (1973) 214.
- ¹¹³ K. Eto. *Tox. Pathol.* 25 (1997) 614.
- ¹¹⁴ M. Kunimoto. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 (1994) 310.
- ¹¹⁵ J. Parizek, I. Ostadalova. *Experiencia.* 23 (1967) 142.
- ¹¹⁶ M.A.A. Cuvín-Arala, R. Funes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21 (1991) 348.
- ¹¹⁷ R. Wagemann, D.C.G. Muri. *Can. Field. Nat.* 86 (1984) 123.
- ¹¹⁸ G.H. Heinz, D.J. Hoffman. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 139.
- ¹¹⁹ D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan. *Arch. Biochem. Biophys.* 170 (1975) 242.
- ¹²⁰ E. Komsta-Szumaska, J. Chmielnicka. *Arch. Toxicol.* 38 (1977) 217.
- ¹²¹ C. Leonzio, S. Focardi, E. Bacci. *Sci. Total. Environ.* 24 (1982) 249.
- ¹²² C. Sasakura, K.T Suzuki. *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 159.
- ¹²³ S. Yoneda, K.T. Suzuki. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997) 274.
- ¹²⁴ L. Magos, M. Webb, A.R Hudson. *Chem. Biol. Interact.* 28 (1979) 359.
- ¹²⁵ Y. Shimamura, I. Mizoguchi, H. Yagyu. *Environ. Res.* 12 (1976) 49.

-
- ¹²⁶K. Itano K, S. Hawai, N. Miyazaki, R. Tatsukawa, T. Fujiyama. *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 1109.
- ¹²⁷D.R. Thompson. *Heavy metals in the marine environment: Metal levels in marine vertebrates*. R.W.Furness, P.S. Rainbows (Eds). Florida, EEUU. 1990
- ¹²⁸R.J. Law. *Environmental contaminants in wildlife, Interpreting tissue concentrations: Metals in marine mammal*. W.N. Beyer, G.H. Heinz, A.W. Redmon-Norwood A.W. (Eds). Florida, EEUU. 1996
- ¹²⁹T. Urano, N. Imura, A. Naganuma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (1997) 862.
- ¹³⁰Y. Hirota, S. Yamaguchi, N. Shimojoh, K. Sano. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 3 (1980) 174.
- ¹³¹J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie. *Br. J. Cancer* 26 (1972) 239.
- ¹³²Y.J. Surh. *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 768.
- ¹³³S. Ramos. *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 427.
- ¹³⁴M. MacFarlane, A.C. Williams. *EMBO Rep.* 5 (2004) 674.
- ¹³⁵J.D. Robertson, S. Orrenius. *Cr. Rev. Toxicol.* 30 (2000) 609.
- ¹³⁶U.Fischer, R.U. Janicke, K. Schulze-Osthoff. *Cell Death Differ.* 10 (2003) 76.
- ¹³⁷A. Zhang, Y. Wu, H.W.L. Lai, D.T. Yew. *Neuroembryology* 3 (2004) 47.
- ¹³⁸D.L.Smith, L.K. Nolden, G.B. Mills, Y. Lu *Apoptosis, senescence and cancer*. D.A. Gewirtz, S.E. Holt, S. Grant (Ed). Humana Press. New Jersey, 2007.
- ¹³⁹K.M. Nicholson, N.G. Anderson. *Cell. Signal.* 14 (2002) 381.
- ¹⁴⁰L.C. Cantley. *Science* 296 (2002) 1655.
- ¹⁴¹S.J. Leever, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield. *Current Opinion in Cell Biology* 11 (1999) 219.
- ¹⁴²P.F. Dijkers, R.H. Medema, J.W. Lammers, L. Koenderman, P.J. Coffey. *Curr. Biol.* 10 (2000) 1201.
- ¹⁴³J.A. Romashkova, S.S. Makarov. *Nature* 401 (1999) 86.
- ¹⁴⁴A. Brunet, S.R. Datta, M.E. Greenberg. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (2001) 297.
- ¹⁴⁵M.J. Robinson, M.H. Cobb *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 180.
- ¹⁴⁶K.B. Reddy, S.M. Nabha, N. Atanaskova. *Cancer Metastasis Rev.* 22 (2003) 395.

-
- ¹⁴⁷ T. Wada, J.M. Penninger. *Oncogene* 23 (2004) 2838.
- ¹⁴⁸ B.A. Ballif, J. Blenis. *Cell Growth Differ.* 12 (2001) 397.
- ¹⁴⁹ M. Karin, E. Gallagher. *IUBMB Life* 57 (2005) 283.
- ¹⁵⁰ M.J. Czaja. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (2003) G875.
- ¹⁵¹ J. Liu, A. Lin. *Cell Res.* 15 (2005) 36
- ¹⁵² A. Porras, S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A.M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito, A.R. Nebreda. *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 922
- ¹⁵³ A.R. Nebreda, A. Porras. *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 257.
- ¹⁵⁴ C. Cámara, C. Pérez-Conde. *Toma y tratamiento de muestra*. C. Cámara (Ed). Síntesis. Madrid. 2002.
- ¹⁵⁵ C. Casiot, J. Spunzar, R.Lobinski, M. Potin-Gautier. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 645.
- ¹⁵⁶ C. Casiot, V. Vacchina, H. Chassaigne, J. Spunzar, M. Potin-Gautier. *Anal. Commun.* 36 (1999) 77.
- ¹⁵⁷ M. Johansson, G. Bordin, A.R. Rodríguez. *Analyst.* 125 (2000) 273.
- ¹⁵⁸ P. Quevauviller, M.B. De la Calle-Gutiñas, E.A. Maier, C. Cámara. *Mikrochim. Acta.* 118 (1995) 131.
- ¹⁵⁹ J.L. Gómez Ariza, E. Morales, D. Sánchez-Rodas, I. Giraldez. *Trens in Anal. Chem.* 19 (2000) 200.
- ¹⁶⁰ T. Lindemann, A. Prange, W. Dannecker, B. Neidhart. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 214.
- ¹⁶¹ M. Deaker, W. Maher. *Anal. Chim. Acta.* 350 (1997) 287.
- ¹⁶² A. Alegría, R. Barbera, R. Farré, A. Moreno. *Die Nahrung.* 6 (1994) 382.
- ¹⁶³ W. Bryce, A. Izquierdo, M.D. Luque de Castro. *Analyst.* 120 (1995) 2171.
- ¹⁶⁴ S. Wu, X. Feng, A. Wittmeier. *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 797.
- ¹⁶⁵ W. Guang Lan, M. Keong Wong, Y. Min Sin. *Talanta.* 41 (1994) 195.
- ¹⁶⁶ W. Guang Lan, M. Keong Wong. *Talanta.* 41 (1994) 53.
- ¹⁶⁷ C. Yan Zhou, M. Keong Wong, L. Lin Koh, Y. Chin Wee. *Mikrochim. Acta.* 127 (1997) 77.

-
- ¹⁶⁸ Z.Wang, Y-X Gao,N. Belzile. *Anal. Chem.* 73 (2001) 4711.
- ¹⁶⁹ M.L. Mena, M.M. Gómez, M. A. Palacios, C. Cámara. *Lab. Autom. Inform. Manag.* 34 (1999) 159.
- ¹⁷⁰ Z. Pedrero, Y. Madrid. *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 135.
- ¹⁷¹ J.L.G. Mar, L.H. Reyes, G.A.M. Rahman, H.M.S. Kingston. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3005.
- ¹⁷² L.H. Reyes, J.L.G. Mar, G.M.M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholzh, H.M.S. Kingston. *Talanta* 78 (2009) 983.
- ¹⁷³ J.L. Capelo, P. Ximénez, Y. Madrid, C. Cámara. *Anal. Chem.* 76 (2004) 233.
- ¹⁷⁴ A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. *Anal. Chem.* 76 (2004) 233.
- ¹⁷⁵ H.Goenaga-Infante, G.O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J. Entwisle, P. Norris, R. Hearn, T. Catterick. *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1529.
- ¹⁷⁶ H. Goenaga-Infante, G.O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J.E. Spallholz, R. Hearn, T. Catterick. *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 864.
- ¹⁷⁷ E. Peachy, K. Cook, A. Castles, C. Hopley, H. Goenaga-Infante. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7001.
- ¹⁷⁸ J.L. Gómez-Ariza, M.A.C. Torre, I. Giraldez, E. Morales. *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 305.
- ¹⁷⁹ S. Mounicou, M. Dernovics, K. Bierla, J. Szpunar. *Talanta* 77 (2009) 1877.
- ¹⁸⁰ J.R. Encinar, M. Sliwka-Kaszynska, A. Polatajko, V. Vacchina, J. Szpunar. *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 171.
- ¹⁸¹ J.R. Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar. *J. Anal. Chem* 75 (2003) 3765.
- ¹⁸² J.R. Encinar, R. Ruzik, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar. *Analyst* 128 (2003) 220.
- ¹⁸³ J.B. Luten, W.Bouquet, M. Burgraff, J. Rus, P. Bratter, P. Schramel (Eds). *Trace Element: Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, de Gruyter, New York, 1987.
- ¹⁸⁴ V.D. Huerta, M.L. Fernández Sánchez, A. Sanz Medel. *J. Anal. At. Spectrom* 19 (2004) 644.
- ¹⁸⁵ S. Roe. *En: Protein purification techniques : a practical approach*. 2nd Edition. **2001**. Oxford University Press.
- ¹⁸⁶ E.L.V. Harris, S. Angal *En: Protein purification methods: a practical approach*. **1989**.

Oxford University Press.

- ¹⁸⁷ J.C. Van Loon. *Anal. Chem.* 51 (1979) 1139A.
- ¹⁸⁸ K.T. Suzuki. *Anal. Biochem.* 102 (1980) 31.
- ¹⁸⁹ K. Sutton, R.M.C. Sutton, J.A. Caruso. *J. Chrom. A* 789 (1997) 85.
- ¹⁹⁰ B. Bouysserie, J. Spuznar, R. Lobinski. *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 805.
- ¹⁹¹ B. Michalke, O. Schramel, A. Kettrup. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363 (1999) 456.
- ¹⁹² J.W. Olesik, J.A. Kinzer, E.J. Grunwald, K.K. Thaxton, S.V. Olesik. *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 239.
- ¹⁹³ M. Moini. *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 466.
- ¹⁹⁴ M.J. Tomlinson, L. Lin, J.A. Caruso. *Analyst.* 120 (1995) 583.
- ¹⁹⁵ A. Montaser, J.A. McLean, H. Liu, J.M. Memet. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. A. Montaser (Ed). New York, 1998.
- ¹⁹⁶ K.E. Jarvis, A.L. Gray, R.S. Houk, Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry, Blackie and Sons, Glasgow, 1992, p. 16.
- ¹⁹⁷ I. Feldmann, M. Jakuboski, D. Stuewer. *Fresen. J. Anal. Chem.* 365 (1999) 415.
- ¹⁹⁸ H. Chassaigne, C.C. Chery, G. Bordin, A.R. Rodriguez. *J. Chromatogr. A.* 976 (2002) 409.
- ¹⁹⁹ S. Mazan, N. Gilon, G. Creitier, J.L. Rocca, J.M. Mermet. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 366.
- ²⁰⁰ I. Feldmann, M. Jakubowski, C. Thomas, D. Stuewer. *Fresen. J. Anal. Chem.* 365 (1999) 422.
- ²⁰¹ J.J. Sloth, E.H. Larsen. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 669.
- ²⁰² D. Wallschlager, J. London. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 1119.
- ²⁰³ R. Thomas. *Spectroscopy* 17 (2002) 42.
- ²⁰⁴ E. McCurdy, D. Potter. *Agilent Technol. ICp-MS J.* 10 (2001).
- ²⁰⁵ D. Kuehnelt, N. Kienzl, D. Juresa. K.A. Francesconi. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 21 (2006) 1264.
- ²⁰⁶ P. Kralj, M. Veber. *Acta. Chim. Slov.* 50 (2003) 633.
- ²⁰⁷ E. Warburton, H. Goenaga-Infante. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 370.

-
- ²⁰⁸ H.E. Taylor, R.A. Huff, A. Montaser. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. A. Montaser (Ed.). Wiley-VCH. Nueva York. 1998.
- ²⁰⁹ J. Spuznar. *Analyst* 130 (2005) 442.
- ²¹¹ A.P. Vonderheide, K. Wrobel, S.S. Kannamkumarath, C.B'Hymer, M. Montes-Bayón, C.P. De Leon, J.A. Caruso. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5722.
- ²¹² C.B'Hymer, J.A. Caruso. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 1531.
- ²¹³ C.B'Hymer, J.A. Caruso. *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 46 (2001) 136.
- ²¹⁴ M. Kotrebai, J.F. Tyson, E. Block, P.C. Uden. *J. Chromatogr A* 866 (2000) 51.
- ²¹⁵ M. Montes-Bayón, E.G. Yanes, C.P. De Leon, K. Jayasimhulu, A. Stalcup, J. Shann, J.A. Caruso. *Anal. Chem.* 74 (2002) 107.
- ²¹⁶ V.D. Huerta, L.H. Reyes, J.M.M. Gayon, M.L.F. Sanchez, A.S. Medel. *J. Anal. Atom. Spectro.* 18 (2003) 1243.
- ²¹⁷ E.H. Larsen *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 310.
- ²¹⁸ L.H. Reyes, F.M. Sanz, P.H. Espilez, J.M. Marchante-Gayon, J.I.G. Alonso, A. Sanza-Medel. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 1230.
- ²¹⁹ S. Mounicou, J. Mejia, J.A. Caruso. *Analyst* 129 (2004) 116.
- ²²⁰ P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutierrez, M.C.P. Conde, C. Camara. *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 315.
- ²²¹ S. Mounicou, S. McSheehy, J. Szpunar, M.P. Gautier, R. Lobinski. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 15.
- ²²² S.P. Mendez, E.B. Gonzalez, A.S. Medel. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 1109.
- ²²³ K.L. Sutton, C.A. Ponce de Leon, K.L. Ackley, R.M.C. Sutton, A.M. Stalcup, J.A. Caruso. *Analyst* 125 (2000) 281.
- ²²⁴ C. Ponce de León, K.L. Sutton, J.A. Caruso, P.C. Uden. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 945.
- ²²⁵ M. Montes-Bayon, C.B'Hymer, C.A. Ponce de Leon, J.A. Caruso. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 945.
- ²²⁶ L.H. Reyes, J.M. Marchante-Gayon, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 1210.

-
- ²²⁷ E. Peachy, K. Cook, A. Castles, C. Hopley, H. Goenaga-Infante. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7001.
- ²²⁸ J.A. Day, S.S. Kannamkumarath, E.G. Yanes, M. Montes-Bayon, J.A. Caruso. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 27.
- ²²⁹ T. DeSmaele, P. Verrept, L. Monees, R. Dams. *Spectrochim. Acta B.* 50 (1995) 1409.
- ²³⁰ N.S. Chong, R.S. Houk. *Spectrosc. Lett.* 41 (1987) 66.
- ²³¹ A. Prange, E. Jantzen. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 10 (1995) 105.
- ²³² J.C.A. Wuilloud, R.G. Wuilloud, A.P. Vonderheide, J.A. Caruso. *Spectrochim. Acta B* 59 (2004) 755.
- ²³³ D. Amouroux, E. Tessier, C. Pecheyran, O.F.X. Donard. *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 241.
- ²³⁴ D. Amouroux, P.S. Liss, E. Tessier, M. Hamren-Larsson, O.F.X. Donard. *Earth Planet. Sci. Lett.* 189 (2001) 277.
- ²³⁵ E. Tessier, D. Amouroux, G. Abril, E. Lemaire, O.F.X. Donard. *Biogeochemistry* 59 (2002) 183.
- ²³⁶ J. Meija, J.M. Bryson, A.P. Vonderheide, M. Montes-Bayón, J.A. Caruso. *J. Agric. Food. Chem.* 51 (2003) 5116.
- ²³⁷ L. Yang, R.E. Sturgeon, W.R. Wolf, R.J. Goldschmidt, Z. Mester. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 1448.
- ²³⁸ A.P. Vonderheide, M. Montes-Bayón, J.A. Caruso. *Analyst* 127 (2002) 49.
- ²³⁹ S.P. Mendez, M. Montes-Bayón, E.B. González, A. Sanz-Medel. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 1333.
- ²⁴⁰ K.A. Francesconi, M. Sperling. *Analyst* 130 (2005) 998.
- ²⁴¹ G. Westöö. *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131.
- ²⁴² R. Puk, J.H. Weber. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 293.
- ²⁴³ S. Padberg, M. Burrow, M. Stoeppler. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346 (1993) 686.
- ²⁴⁴ E. Bulska, D.C. Daxter, W. Frech. *Anal. Chim. Acta* 249 (1991) 545.
- ²⁴⁵ M. Rezende, R. Campos, A. Curtius. *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247.
- ²⁴⁶ M. Horvat, A. Byrne, K. May. *Talanta* 37 (1990) 207.
- ²⁴⁷ A. Alli, R. Jaffe, R. Jones. *J. High Resolut. Chromatogr.* 17 (1994) 745.

-
- ²⁴⁸ G. Decadt, W. Baeyens, D. Bradley, L. Goeyens. *Anal. Chem.* 57 (1985) 2788.
- ²⁴⁹ P. Lansens, W. Baeyens. *Anal. Chim. Acta* 228 (1990).
- ²⁵⁰ M. Filipelli. *Anal. Chem.* 59 (1987) 116.
- ²⁵¹ G. Jiang, H. Bau, Z. Ni, S. Wang. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 334 (1989) 27.
- ²⁵² M. Hempel, H. Hintelmann, R.D. Wilken. *Analyst* 117 (1992) 669.
- ²⁵³ P. Beauchemin, K. Siu, S. Berman. *Anal. Chem.* 60 (1988) 2587.
- ²⁵⁴ Y. Telmi, V. Norwell. *Anal. Chim. Acta* 85 (1976) 203.
- ²⁵⁵ N. Bloom. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46 (1989) 1131.
- ²⁵⁶ Y. Thibaud, D. Cossa. *Appl. Organomet. Chem.* 3 (1989) 257.
- ²⁵⁷ H. Nagase, Y. Ose, T. Sabo, T. Ishikawa, R. Mitani. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 7 (1980) 261.
- ²⁵⁸ M. Horvat, N.S. Bloom, L. Liang. *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 135.
- ²⁵⁹ N. Bloom. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 (1992) 1010.
- ²⁶⁰ C.M. Tseng, A. de Diego, H. Pinaly, D. Amouroux, O.F.X. Donard. *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 755.
- ²⁶¹ A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595.
- ²⁶² H. Emteborg, E. Björklund, F. Odman, L. Karlsson, L. Mathiasson, W. Frech, D. Baxter. *Analyst* 121 (1996) 19.
- ²⁶³ R. Lorenzo, M. Vazquez, A. Carro, R. Cela. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 410.
- ²⁶⁴ W. Meng, F. Weiyue, S. Junwen, Z. Fang, W. Bing, Z. Motao, L. Bai, Z. Yuliang, C. Zhifang. *Talanta* 71 (2007) 2034.
- ²⁶⁵ V. Camel. *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.
- ²⁶⁶ C.M. Tseng, A. de Diego, F.M. Martin, D. Amouroux. *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 743.
- ²⁶⁷ M. Leermakers, H.L. Nguyen, S. Kurunczi, B. Vanneste, S. Galletti, W. Baeyens. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 327.
- ²⁶⁸ M.J. Vazquez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela. *Anal. Chem.* 69 (1997) 221.
- ²⁶⁹ L-F. Chang, S-J. Jiang, A.C. Sahayam. *J. Chromatogr. A.* 1176 (2007) 143.
- ²⁷⁰ S. Río-Segade, C. Bendicho. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1998) 263.

-
- ²⁷¹ S. Branch, L. Ebdon, P. O'Neill. *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 33.
- ²⁷² F. Pannier, A. Astruc, M. Astruc. *Anal. Chim. Acta.* 327 (1996) 287.
- ²⁷³ Y. Tan, W.D. Marshall. *Analyst* 122 (1997) 13.
- ²⁷⁴ D.S. Forsyth, W.D. Marshal. *Anal. Chem.* 55 (1983) 2132.
- ²⁷⁵ D.S. Forsyth, W.D. Marshal. *Environ. Sci. Technol.* 20 (1986) 1033.
- ²⁷⁶ F.R. Abou-Shakra, M.P. Rayman, N.I. Ward, V. Hotton, G. Bastian. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (1997) 429.
- ²⁷⁷ N. Gilon, M. Potin-Gautier, M. Astruc. *J. Chromatogr. A.* 759 (1996) 327.
- ²⁷⁸ N. Gilon, A. Astruc, M. Astruc, M. Potin-Gautier. *Appl. Organomet. Chem.* 9 (1995) 623.
- ²⁷⁹ G.I. Callum, M.M. Ferguson, J.M.A. Lenihan. *Analyst* 106 (1981) 1009.
- ²⁸⁰ R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (2002) 1560.
- ²⁸¹ D.S. Forsyth, V. Casey, R.W. Dabeka, A. McKenzie. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 849.
- ²⁸² S.C. Hight, J. Cheng. *Anal. Chim Acta* 567 (2006) 160.
- ²⁸³ P.B. Tchounwou, W.K. Ayensu, N. Ninashvili, D. Sutton. *Environ. Toxicol.* 18 (2003) 149.
- ²⁸⁴ P. Montuori, E. Jover, R. Alzaga, S. Diez, J.M. Bayona. *J. Chromatogr.* A1025 (2004) 71.
- ²⁸⁵ T. Stoichev, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, E. Tessier, D. Amouroux, O.F.X. Donard. *Talanta* 62 (2004) 433.
- ²⁸⁶ A. Gonzalvez, M.L. Cervera, S. Armenta, M. de la Guardia. *Anal. Chim Acta* 636 (2009) 129.
- ²⁸⁷ L. Magos. *Analyst* 96 (1971) 847.
- ²⁸⁸ F. Ubillús, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M.J. Lagarda. *Food Chem.* 71 (2000) 529.
- ²⁸⁹ S.R. Segade, J.F. Tyson. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 268.
- ²⁹⁰ A.C.P. Monteiro, L.S.N. de Andrade, A.S. de Luna, R.C. de Campos. *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 2103.

-
- ²⁹¹ M.V. Balarama Krsihna, D. Karunasagar, S.V. Rao, J. Arunachalam. *Talanta* 68 (2005) 329.
- ²⁹² W. Jian, C.W. McLeod. *Talanta* 39 (1992) 1537.
- ²⁹³ H. Bagheri, A. Gholami. *Talanta* 55 (2001) 1141.
- ²⁹⁴ S. Fragueiro, I. Lavilla, C. Bendicho. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 250.
- ²⁹⁵ J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979.
- ²⁹⁶ A. Menéndez García, M.L. Fernández Sánchez, J.E. Sánchez Uría, A. Sanz Medel. *Microchim. Acta* 122 (1996) 157.
- ²⁹⁷ J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Medel. *Talanta* 47 (1998) 509.
- ²⁹⁸ R. Pinel. *Analisis* 19 (1991) T19.
- ²⁹⁹ M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat. *Trend. Anal. Chem.* 24 (2005) 383.
- ³⁰⁰ R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Mejuto, M.H. Bollain, M.C. Casais, A. Botana, E. Rubi, I. Medina. *Microchim. Acta* 109 (1996) 111.
- ³⁰¹ M. Filipelli, F. Baldi, J.H. Weber. *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1457.
- ³⁰² C. Diezt, Y. Madrid, C. Cámara, Ph. Quevauviller. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 1349.
- ³⁰³ P.J. Craig, D. Mennie, M.I. Needham, O.F.X. Donard, F. Martin. *J. Organomet. Chem.* 447 (1993) 5.
- ³⁰⁴ M. Horvat, N.S. Bloom, L. Liang. *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 135.
- ³⁰⁵ E. Bulska, D.C. Daxter, W. Frech. *Anal. Chim. Acta* 249 (1991) 545.
- ³⁰⁶ M. Leermakers, H.L. Nguyen, S. Kurunczi, B. Vanneste, S. Galletti, W. Baeyens. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 327.
- ³⁰⁷ W. Baeyens, M. Leermakers, R. Molina, L. Holsbeek, C. Joiris. *Chemosphere* 7 (1999) 1107.
- ³⁰⁸ R. Lobinski, P. Rodriguez, H. Chassaigne, A. Wasik, J. Szpunar. *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 859.
- ³⁰⁹ N. Demuth, K.G. Heumann. *Anal. Chem.* 73 (2001) 4020.
- ³¹⁰ Y. Cai, R. Jaffé, R. Jones. *Envir. Sci. Technol.* 31 (1997) 302.

-
- ³¹¹ T. De Smaele, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. Van de Eycken, J. Vandyck. *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 99.
- ³¹² P. Grinberg, R. Campos, Z. Mester, R. Sturgeon. *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 902.
- ³¹³ M. Abuin, A.M. Carro, R.A. Lorenzo. *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185.
- ³¹⁴ Y. Cai, S. Monsalud, K. Furton. *Chromatographia* 52 (2000) 82.
- ³¹⁵ C.F.Harrington. *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167.
- ³¹⁶ E. Munaf, H. Haraguchi, D. Ishii, T. Takeuchi, M. Goto. *Anal. Chim. Acta* 235 (1990) 399.
- ³¹⁷ E. Palminaso, P. Zambonin, N. Cardellicchio. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346 (1993) 648
- ³¹⁸ R. Falter, H. Scholer. *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 253.
- ³¹⁹ R. Falter, H. Scholer. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 348 (1994) 253.
- ³²⁰ J.M. Costa-Fernández, F. Lunzer, R. Pereiro-García, A. Sanz-Medel, N. Bordel-García. *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 1019.
- ³²¹ D. Schlegel, J. Mattusch, K. Dittrich. *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 261.
- ³²² T. Qiang, W. Johnson, B. Buckley. *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 696.
- ³²³ A.M. Carro-Díaz, R.A. Lorenzo-Ferreira, R. Cela-Torrijos. *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 245.
- ³²⁴ S. Aguerre, G. Lepas, V. Desauziers, M. Potin Gautier. *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 263.
- ³²⁵ J. Leenaerts, W. Van Mol, H. Goenaga Infante, F. Adams. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1492.
- ³²⁶ F. Pedersen, J. de Bruijn, S. Munn, K van Leeuwen K. (2003). *JRC Report EUR* 20863 (2003) 33.
- ³²⁷ R. Requejo, M. Tena. *Phytochemistry* 66 (2005) 1519.
- ³²⁸ M.E. Moreno, C. Perez-Conde, C. Camara. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 666.
- ³²⁹ T. Isaacson, C.M.B. Damasceno, R.S. Saravanan, Y. He, C. Catala, M. Saladie, J.K.C. Rose. *Nat. Protoc.* 1 (2006) 769.
- ³³⁰ J.N. Adkins, S.M. Varnum, K.J. Auberry, R.J. Moore, N.H. Angell, R.D. Smith, D.L. Springer, J.G. Pounds. *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 947.

-
- ³³¹ J.L. Luque-Garcia, T.A. Neubert. *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 259.
- ³³² R. Zhai, S. Su, X. Lu, R. Liao, X. Ge, M. He, Y. Huang, S. Mai, X. Lu, D. Christiani. *Biomaterials* 18 (2005) 603.
- ³³³ N. Ahsan, J. Renaut, S. Komatsu. *Proteomics* 9 (2009) 2602.
- ³³⁴ E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gomez-Gomez. *Anal. Chem.* 81 (2009) 3507.
- ³³⁵ S. Beranova-Giorgianni. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 273.
- ³³⁶ H. Zhang, C. Lian, Z. Shen. *Ann. Bot.* 103 (2009) 923.
- ³³⁷ X.P. Ling, J.Y. Zhu, L. Huang, H.Q. Huang. *Environ. Toxicol. Pharm.* 27 (2009) 212.
- ³³⁸ P. Le Lay, M.P. Isaure, J.E. Sarry, L. Kuhn, B. Fayard, J.L. Le Bail, O. Bastien, J. Garin, C. Roby, J. Bourguignon. *Proteomics* 6 (2006) 2180.
- ³³⁹ W. Wang, M. Scali, R. Vignani, A. Spadafora, E. Sensi, S. Mazzuca, M. Cresti. *Electrophoresis* 24 (2003) 2369.
- ³⁴⁰ C. Vannini, M. Marsoni, G. Domingo, F. Antognoni, S. Biondi, M. Bracale. *Chemosphere* 76 (2009) 1372.
- ³⁴¹ M. Dachenko, L. Skultety, N.M. Rashidov, V.V. Berezhna, L. Matel, T. Salaj, A. Petrova, M. Hajduch. *J. Proteome Res. B* 8 (2009) 2915.
- ³⁴² S. Keyvanshokoo, B. Vaziri, A. Gharai, F. Mahboudi, A. Esmaili-Sari, M. Shahriari-Moghadam. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genomics Proteomics* 4 (2009) 243.
- ³⁴³ S. Zhang, J. Fu, Z. Zhou. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (2005) 13.
- ³⁴⁴ R. Aina, M. Labra, P. Fumagalli, C. Vannini, M. Marsoni, U. Cucchi, M. Bracale, S. Sgorbati, S. Citterio. *Environ. Exp. Bot.* 59 (2007) 381.
- ³⁴⁵ Y. Zhen, J.L. Qi, S.S. Wang, J. Su, G.H. Xu, M.S. Zhang, L. Miao, X.X. Peng, D. Tian, Y.H. Yang. *Physiol. Plant* 131 (2007) 542.
- ³⁴⁶ N. Ahsan, D.G. Lee, S.H. Lee, K.Y. Kang, J.J. Lee, P.J. Kim, H.S. Yoon, J.S. Kim, B.H. Lee. *Chemosphere* 67 (2007) 1182.
- ³⁴⁷ K. Lee, D.W. Bae, S.H. Kim, H.J. Han, X. Liu, H.C. Park, C.O. Lim, S.Y. Lee, W.S. Chung. *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 161.
- ³⁴⁸ C. Baker-Austin, M. Dopson, M. Wexler, R.G. Sawers, P.L. Bond. *Microbiology* 151 (2005) 2637.

-
- ³⁴⁹ D.S. Chen, K.M. Chan. *Aquat. Toxicol.* 94 (2009) 163.
- ³⁵⁰ F. Ge, X.P. Lu, H.L. Zeng, Q.Y. He, S. Xiong, L. Jin, Q.Y. He. *J. Proteome Res.* 8 (2009) 3006.
- ³⁵¹ M. Usami, M. Nakajima, K. Mitsunaga, A. Miyajima, M. Sunouchi, O. Doi. *Reprod. Toxicol.* 28 (2009) 300.
- ³⁵² M. Usami, K. Mitsunaga, K. Nakazawa. *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 521.
- ³⁵³ T. Fukuda, A. Saito, J. Wasaki, T. Shinano, M. Osaki. *Plant Sci.* 172 (2007) 1157.
- ³⁵⁴ K. Vido, D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M.B. Toledano, J. Labarre. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8469.
- ³⁵⁵ H.B. Chen, L. Huang, Q.Y. Huang, X.P. Ling, F. Zhu, H.Q. Huang. *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 801.
- ³⁵⁶ S. Keyvanshokoo, B. Vaziri, A. Gharaei, F. Mahboudi, A. Esmaili-Sari, M. Shahriari-Moghadam. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genomics Proteomics* 4 (2009) 243.
- ³⁵⁷ Q. Zhang, L. Zhang, X. Xiao, Z. Su, P. Zou, H. Hu, Y. Huang, Q.Y. He. *Toxicol. In Vitro* 24 (2010) 1098.
- ³⁵⁸ E. Gianazza, R. Wait, A. Sozzi, S. Regondi, D. Saco, M. Labra, E. Agradi. *Chemosphere* 62 (2006) 1234.
- ³⁵⁹ M. Danchenko, L. Skultety, N.M. Rashydov, V.V. Berzhna, L. Matel, T. Salaj, A. Pretova, M. Hajduch. *J. Proteome Res.* 8 (2009) 2915.
- ³⁶⁰ N.K. Kilic, A. Stensballe, D.E. Otzen, G. Donmez. *Bioresur. Technol.* 101 (2010) 2134.
- ³⁶¹ V. Santoni, M. Molloy, T. Rabilloud. *Electrophoresis* 21 (2000) 1054.
- ³⁶² .E. Bandow. *Proteomics* 10 (2010) 1416.
- ³⁶³ J.S. Minden, S.R. Dowd, H.E. Meyer, K. Stuhler. *Electrophoresis* 21 (2000) 1054.
- ³⁶⁴ S. Dorts, P. Kestemont, M. Dieu, M. Raes, F. Silvestre. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. Suppl. 1* (2009) S17.
- ³⁶⁵ P. Kieffer, J. Dommes, L. Hoffmann, J.F. Hausman, J. Renaut. *Proteomics* 8 (2008) 2514.
- ³⁶⁶ M. Fagioni, G.M. D'Amici, A.M. Timperio, L. Zolla. *J. Proteome Res.* 8 (2009) 310.

-
- ³⁶⁷ M.M. Fecht-Christoffers, H.P. Braun, C. Lemaitre-Guillier, A. Van Dorsselaer, W.J. Horst. *Plant Physiol.* 133 (2003) 1935.
- ³⁶⁸ H. Führs, M. Hartwig, L.E. Molina, D. Heintz, A. Van Dorsselaer, H.P. Braun, W.J. Horst. *Proteomics* 8 (2008) 149.
- ³⁶⁹ G. Visioli, M. Marmiroli, N. Marmiroli. *J. Biomed. Biotechnol.* 129 (2010) 565.
- ³⁷⁰ A. Koller, M.P. Washburn, B.M. Lange, N.L. Andon, C. Deciu, P.A. Haynes, L. Hays, D. Schieltz, R. Ulaszek, J. Wei, D. Wolters, J.R. Yates 3rd *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11969.
- ³⁷¹ S. Kennedy. *Biomarkers* 7 (2002) 269.
- ³⁷² M. Mann. *Nature (London)* 7 (2006) 952.
- ³⁷³ L.R. Zieske. *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 1501.
- ³⁷⁴ J. Kellermann. *Methods Mol. Biol.* 424 (2008) 113.
- ³⁷⁵ D. Wildes, J.A. Wells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 4561.
- ³⁷⁶ A. Ramos-Fernandez, D. Lopez-Ferrer, J. Vazquez. *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1274.
- ³⁷⁷ J. Grossmann, B. Roschitzki, C. Panse, C. Fortes, S. Barkow-Oesterreicher, D. Rutishauser, R. Schlapbach. *J. Proteomics* 7 (2010) 324.
- ³⁷⁸ J. Patterson, K. Ford, A. Cassin, S. Natera, A. Bacic. *Plant Physiol.* 144 (2007) 1612.
- ³⁷⁹ M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1017.
- ³⁸⁰ S.E. Ong, M. Mann. *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 252.
- ³⁸¹ S.E. Ong, L.J. Foster, M. Mann. *Methods* 29 (2003) 124.
- ³⁸² Y. Oda, K. Huang, F.R. Cross, D. Cowburn, B.T. Chait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 6591.
- ³⁸³ T.D. Veenstra, S. Martinovic, G.A. Anderson, L. Pasa-Tolic, R.D. Smith. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 78.
- ³⁸⁴ S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann. *Mol Cell Proteomics* 1 (2002) 376.
- ³⁸⁵ A. Prange, D. Prätor. *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 432.
- ³⁸⁶ O.A. Mirgorodskaya, Y.P. Kozmin, M.I. Titov, R. Korner, C.P. Sonksen, P. Roepstorff. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1226.

-
- ³⁸⁷ X.D. Yao, A. Freas, J. Ramirez, P.A. Demirev, C. Fenselau. *Anal. Chem.* 73 (2001) 2836.
- ³⁸⁸ Y.K. Wang, Z.X. Ma, D.F. Quinn, E.W. Fu. *Anal. Chem.* 73 (2001) 3742.
- ³⁸⁹ I.I. Stewart, T. Thomson, D. Figeys. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2456.
- ³⁹⁰ S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold. *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 994.
- ³⁹¹ R.J. Zhang, C.S. Sioma, R.A. Thompson, L. Xiong, F.E. Regnier. *Anal. Chem.* 74 (2002) 3662.
- ³⁹² R.J. Zhang, C.S. Sioma, S.H. Wang, F.E. Regnier. *Anal. Chem.* 73 (2001) 5142.
- ³⁹³ J.X. Li, H. Steen, S.P. Gygi. *Mol. Cell. Proteom.* 2 (2003) 1198.
- ³⁹⁴ A. Schmidt, J. Kellermann, F. Lottspeich. *Proteomics* 5 (2005) 4.
- ³⁹⁵ D.R. Goodlett, A. Keller, J.D. Watts, R. Newitt, E.C. Yi, S. Purvine, J.K. Eng, P. von Haller, R. Aebersold, E. Kolker. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1214.
- ³⁹⁶ J.E. Syka, J.A. Marto, D.L. Bai, S. Horning, M.W. Senko, J.C. Schwartz, B. Ueberheide, B. Garcia, S. Busby, T. Muratore, J. Shabanowitz, D.F. Hunt. *J. Proteome. Res.* 3 (2004) 621.
- ³⁹⁷ S. Wiese, K.A. Reidgeld, H.E. Meyer, B. Warscheid. *Proteomics* 7 (2007) 1004.
- ³⁹⁸ S.A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M.W. Kirschner, S.P. Gygi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(2003) 6940.
- ³⁹⁹ S. Pan, H. Zhang, J. Rush, J. Eng, N. Zhang, D. Patterson, M.J. Comb, R. Aebersold. *Mol Cell Proteomics* 4 (2005) 182.
- ⁴⁰⁰ D.S. Kirkpatrick, S.A. Gerber, S.P. Gygi. *Methods* 35 (2005) 265.
- ⁴⁰¹ A. Abramsson, J. Pannee, C. Gang, M.K. Gustavsson, M. Otterm, K. Blennow, G. Brinkmalm, H. Heumann, H. Zetterberg. *J. Proteomics* 75 (2011) 425.
- ⁴⁰² W.W. Wu, G. Wang, P.A. Insel, C. Hsiao, S. Zou, B. Martin, S. Maudsley, R. Sheng. *J. Proteomics* 75 (2012) 2480-2487
- ⁴⁰³ S.M. Conley, B.S. McKay, A.J. Gandolfi, W.D. Stamer. *Exp. Eye. Res.* 82 (2006) 637.